

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II

DIPARTIMENTO DI STRUTTURE, FUNZIONI E  
TECNOLOGIE BIOLOGICHE

DOTTORATO DI RICERCA IN BIOLOGIA, PATOLOGIA E  
IGIENE AMBIENTALE IN MEDICINA VETERINARIA  
XXIII CICLO

Coordinatore: Chiar.mo Prof. G. Paino

TESI DI DOTTORATO

“Espressione dell’orexina A e del recettore 1 per l’orexina  
nell’apparato genitale dei mammiferi”

Docente guida:

Chiar.mo Prof. Norma Staiano

Tutor:

Chiar.mo Prof. Simona Tafuri

Candidata:

Dr. Roberta Lo Muto

ANNO ACCADEMICO 2009-2010

# INDICE

<b>Capitolo 1: Introduzione</b>	pag. 4
1.1 Struttura e funzione delle orexine	pag. 4
1.2 Espressione e funzione delle orexine e dei relativi recettori nel sistema nervoso centrale	pag. 11
1.3 Espressione e funzione delle orexine e dei recettori nelle strutture periferiche	pag. 19
<b>Capitolo 2: Scopo del lavoro di tesi</b>	pag. 23
<b>Capitolo 3: Materiali e metodi</b>	pag. 28
3.1 Reagenti chimici ed anticorpi	pag. 28
3.2 Prelievo dei campioni	pag. 29
3.3 Immunoistochimica	pag. 29
3.4 Preparazione di omogenati di tessuto	pag. 31
3.5 Elettroforesi SDS-PAGE e Western blotting	pag. 31
3.6 Estrazione di RNA da tessuti	pag. 33
3.7 RT-PCR	pag. 34
<b>Capitolo 4: Risultati</b>	pag. 38
4.1 Localizzazione di OxA e Ox1R nel complesso uretro-prostatico del bovino: analisi immunoistochimica	pag. 38

4.2 Espressione della prepro-orexina e di Ox1R nel complesso uretro-prostatico del bovino: analisi biochimiche	pag. 40
4.3 Localizzazione di OxA e Ox1R nella ghiandola vestibolare del bovino: analisi immunoistochimica	pag. 42
4.4 Espressione della prepro-orexina e di Ox1R nella ghiandola vestibolare del bovino: analisi biochimiche	pag. 44
4.5 Localizzazione di OxA e Ox1R nell'epididimo di ratto: analisi immunoistochimica	pag. 47
4.6 Espressione della prepro-orexina e di Ox1R nell'epididimo di ratto: analisi biochimiche	pag. 49
4.7 Localizzazione di OxA nel testicolo di ratto: analisi immunoistochimica	pag. 52
4.8 Espressione della prepro-orexina nel testicolo di ratto: analisi biochimiche	pag. 55
<b>Capitolo 5: Discussione e Conclusioni</b>	pag. 57
<b>Capitolo 6: Bibliografia</b>	pag. 67
<b>Capitolo 7: Ringraziamenti</b>	pag. 87
<b>Capitolo 8: Elenco dei lavori pubblicati</b>	pag. 89

# 1.INTRODUZIONE

## 1.1 Struttura e funzione delle orexine

La scoperta delle orexine risale al 1998 ad opera di due gruppi di ricerca indipendenti. Il primo gruppo coordinato da de Lecea ha identificato nell'ipotalamo di ratto l'RNA messaggero (mRNA) di due proteine che ha denominato rispettivamente ipocretina 1 e ipocretina 2. Il secondo gruppo coordinato da Sakurai ha individuato i ligandi endogeni di due recettori accoppiati alle proteine G che ha denominato orexina A e orexina B. I peptidi ipocretina1/2 e orexina A/B sono risultati simili (Matsuki and Sakurai, 2008). Attualmente si usano indifferentemente i termini ipocretine/orexine per indicare tali peptidi. Il termine orexina, derivante dal greco "orexis" che significa "appetito", fu attribuito sulla base dell'osservazione che la somministrazione centrale di orexine aumentava notevolmente l'assunzione di cibo nei ratti (Sakurai et al., 1998).

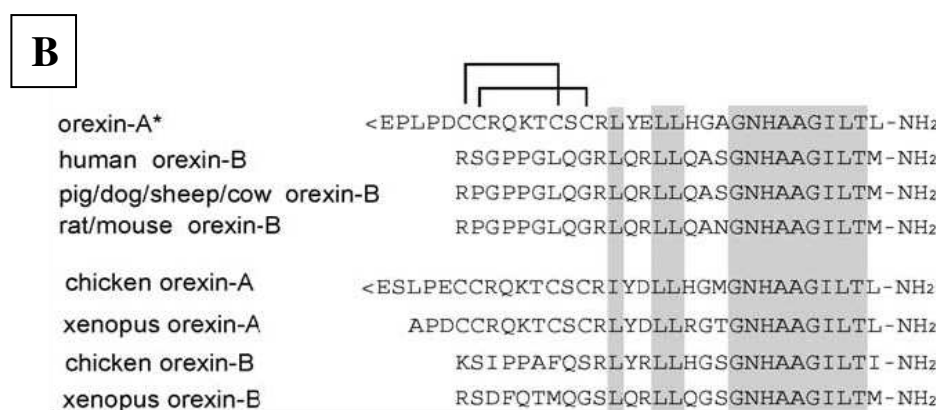
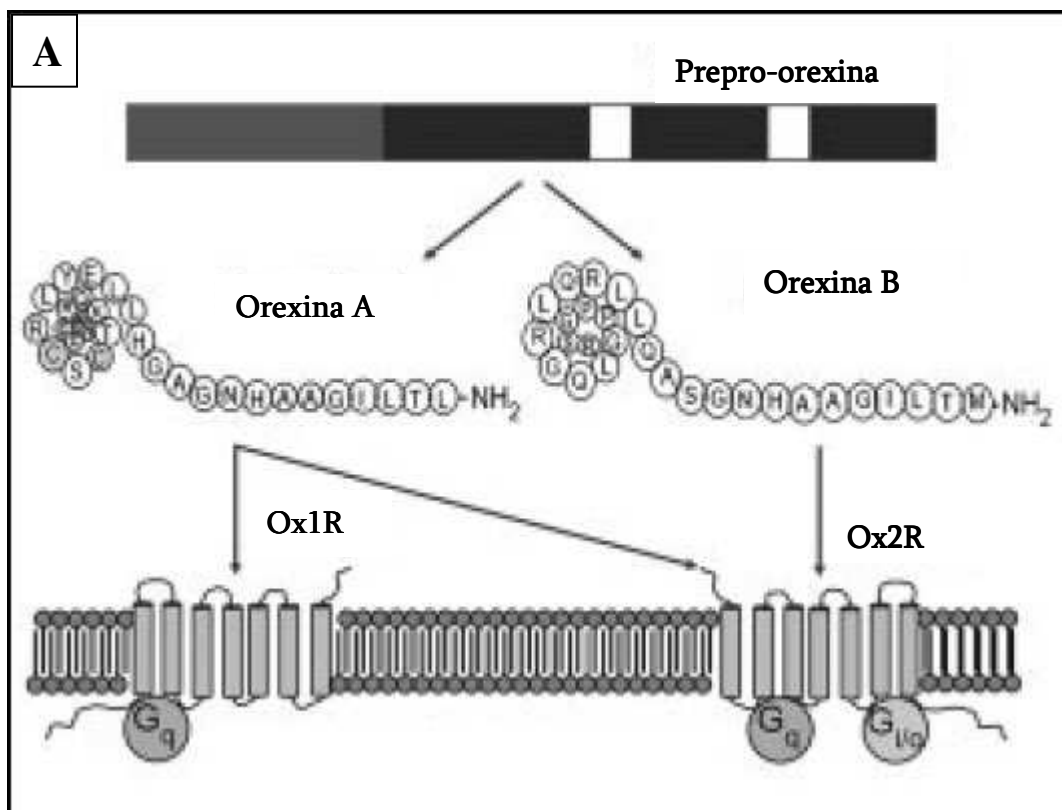
Le orexine sono prodotte dalla scissione di un precursore comune, la prepro-orexina, una proteina di 130 amminoacidi il cui gene umano, localizzato sul cromosoma 17, comprende 1432 coppie di basi ed è costituito da due esoni ed un introne. Il taglio

proteolitico della prepro-orexina porta alla formazione dell'orexina A (OxA) e dell'orexina B (OxB) (Figura 1).

L'OxA è un peptide di 33 amminoacidi (3.562 Da), con la porzione N-terminale contenente residui di acido piroglutammico ed una porzione C-terminale amidata. Essa presenta due ponti disolfuro che si formano da quattro residui cisteinici, in particolare Cys 6-12 e Cys 7-14 (Figura 2). La sequenza amminoacidica dell'OxA è ben conservata nell'uomo, nel bovino, nel topo e nel ratto, nella pecora, nel cane e nel maiale (Sakurai et al., 1998; Dyer et al., 1999).

L'OxB è un peptide lineare di 28 amminoacidi con il C-terminale amidato ed un peso molecolare di 2.937 Da. L'OxB mostra il 46% di identità con l'OxA. Le sequenze dell'OxA e OxB nei pesci, nello *Xenopus* e nel pollo sono altamente conservate se confrontate a quelle dei mammiferi (Shibahara et al., 1999; Sakurai et al., 2005). Le orexine mostrano, inoltre, un'omologia strutturale con il glucagone, il peptide intestinale vasoattivo (VIP) e peptidi della famiglia della secretina (Sakurai et al., 1998).

**Figura 1**

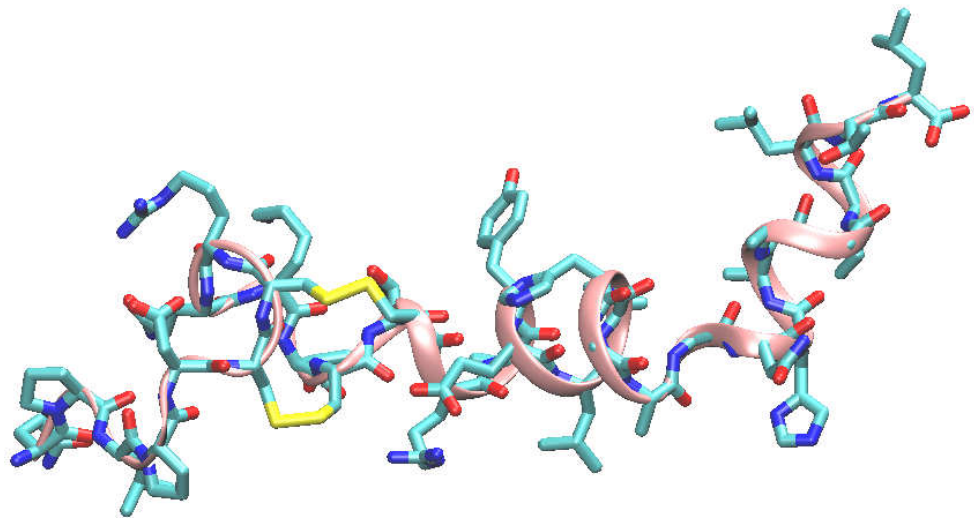


**(A) Rappresentazione schematica del sistema delle orexine**

**(B) Strutture delle forme mature dei peptidi orexina A e B di diverse specie animali\**

da Sakurai T.: *Regul Pept* 126, 3-10, 2005

**Figura 2**



**Struttura tridimensionale dell'orexina A**

Le orexine furono originariamente ritrovate nell'ipotalamo laterale e posteriore che sono le regioni del cervello che regolano l'appetito e l'omeostasi energetica (Sakurai et al., 1998). Somministrazioni intra-cerebro-ventricolari (ICV) di OxA nei ratti provocano una stimolazione dose-dipendente dell'assunzione di cibo, mentre gli effetti in seguito a somministrazione di OxB sono più lievi. Inoltre, la somministrazione ICV di anticorpi anti-OxA blocca l'assunzione di cibo dopo un periodo di digiuno (Yamada et al., 2000) e la somministrazione intra-peritoneale (IP) dell'antagonista del recettore 1 di OxA denominato SB-334867 aumenta lo stato di sazietà e blocca l'effetto iperfagico dell'OxA nei ratti (Rodgers et al., 2001).

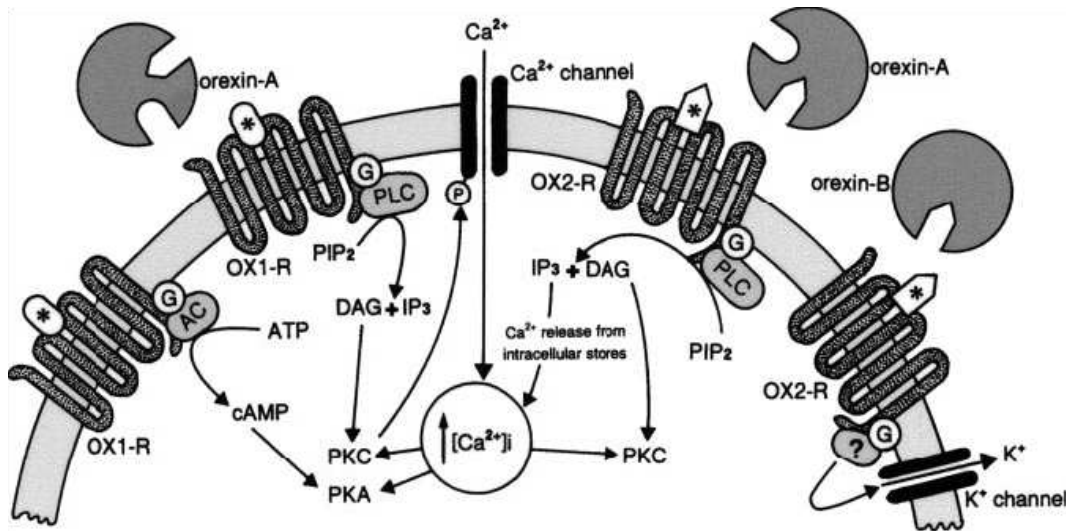
Nei mammiferi sono stati identificati due tipi di recettori per le orexine, entrambi appartenenti alla famiglia dei recettori accoppiati alle proteine G, denominati rispettivamente recettore 1 (Ox1R) e 2 (Ox2R) (Sakurai et al., 1998; Trivedi et al., 1998, Sakurai et al., 2005). In particolare, Ox1R è accoppiato esclusivamente alla sottoclasse Gq delle proteine G, mentre Ox2R è accoppiato sia alla sottoclasse Gq che a quella Gi/o (Zhu et al., 2003) (Figura 1A). I recettori Ox1R e Ox2R nell'uomo sono costituiti rispettivamente da 425 e 444 amminoacidi e mostrano un'omologia di sequenza del 64%. Ox1R e Ox2R del ratto e dell'uomo presentano rispettivamente il 94% ed il 95% di omologia di



sequenza (Sakurai et al., 1998). Il recettore Ox1R lega preferenzialmente OxA, mentre Ox2R presenta affinità per entrambe le orexine (Figura 3) (Lund et al., 2000; Eggermann et al., 2001). Ulteriori studi sul topo hanno dimostrato che il cDNA di Ox1R codifica per una proteina di 416 amminoacidi, mentre esistono due varianti da “splicing” alternativo per Ox2R: Ox2 $\alpha$ R (443 amminoacidi) e Ox2 $\beta$ R (460 amminoacidi) (Chen et al., 2004).

Nelle cellule ovariche di criceto cinese (CHO) l’attivazione di entrambi i recettori incrementa la concentrazione di calcio intracellulare e la stimolazione diretta della fosfolipasi C (Lund et al., 2000). Entrambe le orexine inducono il rilascio di noradrenalina da porzioni cerebrocorticali di ratto, parzialmente dipendente dal Ca<sup>2+</sup> extracellulare (Hirota et al., 2001). Nei topi l’attivazione dei recettori orexinici induce il turn-over dell’inositolo trifosfato (IP3) (Kukkonen et al., 2001).

### Figura 3



**Rappresentazione schematica dei principali processi di trasduzione attivati dall'interazione dell'OxA e OxB con i recettori Ox1R e Ox2R.**

**Abbreviazioni:** G, proteine G; P, sito di fosforilazione; PKC, protein chinasi C; PKA, protein chinasi A; IP<sub>3</sub>, inositolo trifosfato; PLC, fosfolipasi C; PIP<sub>2</sub>, fosfatidilinositolo bisfosfato; DAG, diacilglicerolo.

Gli asterischi indicano i siti di riconoscimento dei recettori.

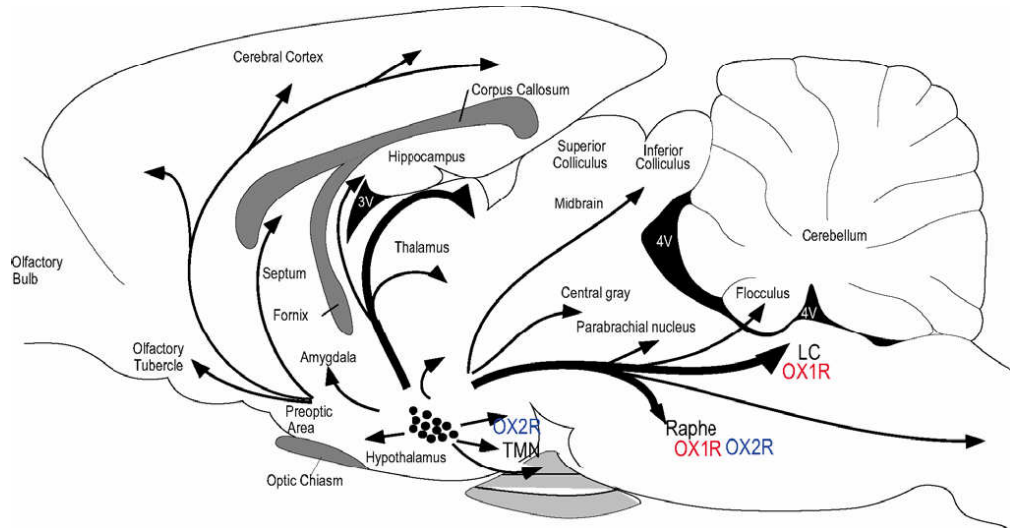
da Spinazzi et al.: Pharmacol Rev 58, 46-57, 2006

## **1.2 Espressione e funzione delle orexine e dei recettori nel sistema nervoso centrale**

I primi studi hanno identificato le orexine ed i recettori nell'ipotalamo del cervello dei mammiferi (Figura 4) (De Lecea et al., 1998; Sakurai et al., 1998; Trivedi et al., 1998; Lu et al., 2000; Greco and Shiromani, 2001; Hervieu et al., 2001; Marcus et al., 2001).

Nel cervello di ratto l'RNA messaggero (mRNA) per la prepro-orexina e immunoreattività alle orexine sono state evidenziate in distinte popolazioni di neuroni nell'ipotalamo laterale (LH), dorsale e perifornicale (PFH) con proiezioni su differenti nuclei ipotalamici (de Lecea et al., 1998; Peyron et al., 1998; Sakurai et al., 1998; Chen et al., 1999; Cutler et al., 1999; Date et al., 1999; Nambu et al., 1999; Taheri et al., 1999; Briski and Sylvester, 2001; Fadel and Deutch, 2002; Cheng et al., 2003), nell'area preottica mediale (Date et al., 1999; Kohsaka et al., 2001) e nell'eminenza mediana (Chen et al., 1999; Russell et al., 2001; Cheng et al., 2003).

**Figura 4**



### Organizzazione del sistema neuronale delle orexine

Abbreviazioni: LC, locus coeruleus; TMN, nucleo tuberomamillare

da Sakurai T.: *Regul Pept* 126, 3-10, 2005

Analisi immunocitochimiche hanno rivelato una massiccia innervazione sinaptica di cellule catecolaminergiche presenti nel tronco encefalico da parte di terminali assonici orexinergici in ratti e scimmie. (Trivedi et al., 1998; Horvath et al., 1999). Le estese proiezioni extra-ipotalamiche dell'orexina comprendono la corteccia cerebrale, l'ippocampo, l'amigdala, i nuclei mediali talamici, il periacquedotto grigio, i nuclei del raphe, l'area segmentale ventrale, il locus coeruleus (LC), l'area postrema, i nuclei del tratto solitario ed il midollo spinale. Tale distribuzione è stata riscontrata nei primati (Horvath et al., 1999; Moore et al., 2001).

Immunoreattività ad OxA è stata riscontrata in neuroni che contengono vasopressina ed ossitocina (nuclei sopraottici), VIP (nuclei soprachiasmatici), somatostatina (nuclei periventricolari), neuropeptide Y (NPY), pro-opiomelanocortina (POMC) ed anfetamine (ipotalamo ventrolaterale), melanina ed istamina (nuclei tuberomammillari) (TMN) (Backberg et al., 2002). *In vitro* OxA stimola l'ormone della crescita (GH) (Chen et al., 2003; Xu et al., 2002; Xu et al., 2003) ed *in vivo* ha un effetto regolatore sulla produzione di GH (Lopez et al., 2004; Seoane et al., 2004). Neuroni orexinergici mostrano immunoreattività al recettore della leptina nell'ipotalamo laterale (Hakansson et al., 1999).

Il recettore Ox1R è ampiamente espresso nei nuclei arcuati, soprachiasmatici e ventromediali dell'ipotalamo, mentre il recettore Ox2R è maggiormente espresso nei nuclei paraventricolari (PVN) (Russel et al., 2001). Oltre che nell'ipotalamo, Ox1R è presente soprattutto nel LC ed, in apprezzabili quantità, nei nuclei olfattivi, nella corteccia piriforme, nel talamo, nell'ippocampo, nei nuclei tegmentali dorsali, nei nuclei dorsali del raphe, nel midollo spinale (Hervieu et al., 2001), nel nucleo arcuato (ARC), nell'eminenza mediana (ME), nei nuclei laterali ipotalamici e nell'area preottica. Il recettore è stato, inoltre, ritrovato lungo il terzo ventricolo dai nuclei paraventricolari a quelli ipotalamici ventromediali (VMH).

Ox2R, invece, è altamente espresso nel VI strato della corteccia, nell'amigdala, nei nuclei mesencefalici trigeminali, nei nuclei reticolari pontini, nei nuclei cocleari ventrali (Russel et al., 2001), nei PVN, ARC, ME, VMH, in una piccola regione della superficie ventrale preottica (Zhang et al., 2005), nella corteccia cerebrale, nel nucleo accumbens, nel subtalamico e nei nuclei paraventricolari del talamo e di quello anteriore pretettale.

Di particolare rilievo risulta l'immunoreattività di Ox1R in più del 90% dei neuroni dei nuclei arcuati che esprimono anche NPY e nei neuroni dell'ipotalamo laterale positivi alle orexine (Backberg et al., 2002).

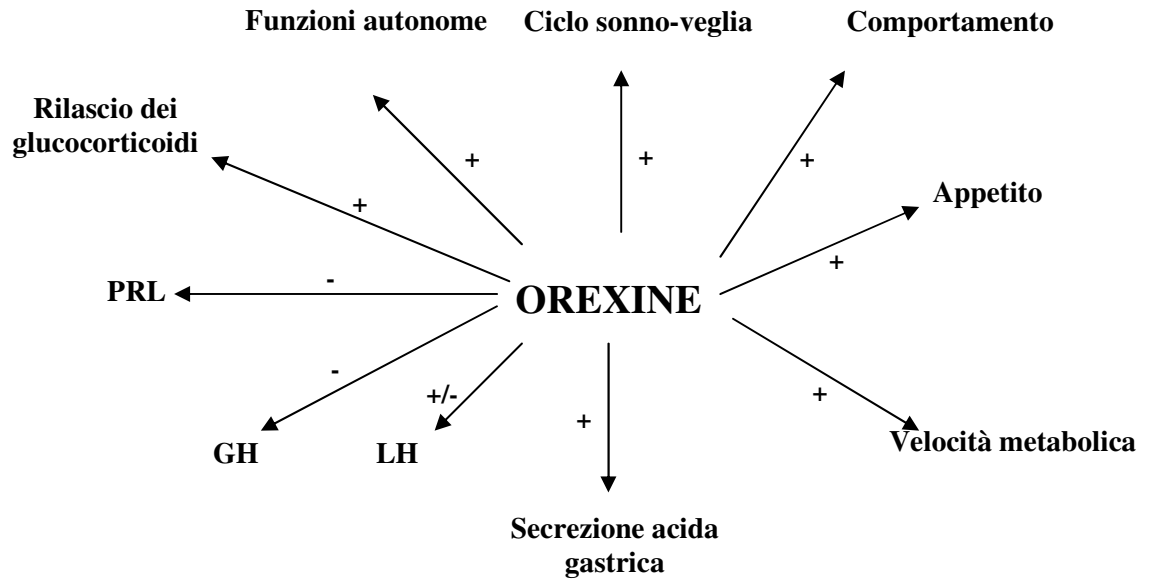
Entrambi i recettori, inoltre, sono espressi nel lobo anteriore dell'ipofisi intermedia e posteriore, benchè nel lobo anteriore Ox1R sia più marcatamente espresso rispetto ad Ox2R (Date et al., 2000). Il recettore Ox1R è presente nelle cellule acidofile, che rappresentano la metà della popolazione totale di cellule dell'adenoipofisi. Ox2R, invece, è presente nelle cellule basofile dell'ipofisi anteriore che co-esprimono l'ormone adrenocorticotropo (ACTH) (Blanco et al., 2001).

Nella ghiandola pineale risulta espresso mRNA che codifica per Ox2R, mentre non è stato rilevato l'mRNA per Ox1R (Mikkelsen et al., 2001). Recentemente, i livelli di mRNA per Ox1R ipotalamici sono stati messi in relazione con le fasi del ciclo estrale delle femmine di ratto (Wang et al., 2003), dimostrando che essi aumentano durante il tardo proestro e nei primi mesi di lattazione.

Mediante il legame al recettore Ox1R le orexine sono capaci di influenzare la secrezione di neuropeptidi ipotalamici implicati nella regolazione dell'appetito (Sakurai et al., 1998). Studi recenti indicano che Ox1R può agire come autoregolatore inibitorio somato-dendritico e come recettore post-sinaptico (Kukkonen et al., 2002).

Le orexine e i loro recettori essendo, quindi, presenti in varie strutture del SNC possono regolare molteplici funzioni (Figura 5).

**Figura 5**



**Principali funzioni fisiologiche delle orexine**

*Abbreviazioni:* PRL, prolattina; GH, ormone della crescita; LH, ormone luteinizzante.

*da Samson and Resch: TEM 11, 257-262, 2000*



Le orexine svolgono diversi ruoli nell'attivazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene (HPA). Uno di questi è l'effetto modulatorio sulla proliferazione delle cellule surrenali (Malendowicks et al., 2001; Mazzocchi et al., 2001; Spinazzi et al., 2005a). Esiste un legame tra l'attivazione delle strutture centrali e il rilascio di steroidi surrenali. Incrementi dose-dipendente di corticosterone sono stati osservati dopo iniezione ICV di OxA con parallelo aumento dell'espressione di c-Fos nei PVN (Ida et al., 2000; Al-Barazani et al., 2001). Nelle stesse condizioni sperimentali, OxB risulta meno efficace di OxA, tuttavia, essa influenza i livelli di corticosterone dopo somministrazione periferica (IP). Da espianti ipotalamici è stato determinato che OxA potrebbe stimolare il rilascio di corticotropina (CRF) e NPY. (Russell et al., 2001).

La localizzazione dei neuroni orexinergici nell'ipotalamo dorso-laterale ha suggerito il ruolo dell'OxA nei meccanismi di regolazione dell'assunzione di cibo e dell'omeostasi energetica (Sakurai et al., 1998; Date et al., 1999; Kukkonen et al., 2002). L'espressione della prepro-orexina è stimolata dal digiuno prolungato o da ipoglicemia (Griffond et al., 1999) mentre risulta diminuita in modelli animali di obesità genetica (Hara et al., 2001). Sono state dimostrate, infatti, correlazioni tra l'azione dell'OxA e

quella di altri peptidi con funzione regolatoria dell'assunzione di cibo, quali leptina, NPY, ormone concentrante la melanina (MCH), POMC ed altri (Kukkonen et al., 2002).

Il neuropeptide OxA è coinvolto nei processi cognitivi autonomi e comportamentali (Kukkonen et al., 2002). Le orexine, in particolare OxA, quando iniettate ICV, si sono dimostrate efficaci in risposte comportamentali indotte dalla nocicezione termica, meccanica e chimica, mentre l'iniezione periferica sottocutanea (SC) è risultata completamente inefficace. Gli effetti dell'OxA sono bloccati dagli antagonisti dei recettori per l'adenosina e per la teofillina, ma non dal naloxone, suggerendo un possibile coinvolgimento dei neuroni contenenti adenosina e/o del processo di trasduzione di segnali mediato dall'adenosina. OxA ha mostrato, anche, un effetto analgesico dopo essere stata somministrata per via IV, ma non SC. Tale effetto è bloccato da un antagonista di Ox1R, ma non dal naloxone (Bingham et al., 2001). Tali risultati dimostrano che il sistema di oppiacei non è coinvolto in questa risposta e che l'OxA agisce su recettori situati nel cervello e nel midollo spinale. OxA, inoltre, regola il ritmo sonno-veglia, aumentando lo stato di veglia, e stimola l'attività motoria (Mileykovskil et al., 2002). E' ampiamente documentato che l'assenza di OxA è alla base della patogenesi della narcolessia

(Thannickal et al., 2000; Mignot et al., 2002). La presenza del peptide è stata riscontrata nell'urina e nel plasma umano (Arihara et al., 2001; Takahashi et al., 2006) di pazienti affetti da narcolessia (Thannickal et al., 2000). Topi knock-out per l'OxA esibiscono un fenotipo molto simile a quello di pazienti affetti da narcolessia, così come il modello canino canarc-1, l'unico modello monogenico di narcolessia che esibisce una mutazione nel recettore Ox2R (Chemelli et al., 1999). Studi post-mortem su soggetti affetti da narcolessia hanno mostrato ridotti livelli di OxA (Thannickal et al., 2000).

### **1.3 Espressione e funzione delle orexine e dei recettori nelle strutture periferiche**

Le orexine ed i loro recettori sono presenti, oltre che nel SNC, anche in molti altri organi dei mammiferi (Shibahara et al., 1999; Mercer et al., 2001; Blanco et al., 2003). I neuroni orexigenici ed i recettori per le orexine sono presenti in ramificazioni del nervo vago nel testicolo, nelle ghiandole surrenali, nei reni e nella placenta (Johren et al., 2001; Nakabayashi et al., 2003; Barreiro et al., 2005; Takahashi et al., 2006). L'Oxa ed i recettori 1 e 2 si trovano nei plessi sottomucoso e mienterico del piccolo intestino, nel pancreas eso-

endocrino e nelle cellule endocrine dello stomaco e dell'intestino tenue (Kirkgessner et al., 1999).

L'OxA sembra svolgere un ruolo importante nella funzionalità della ghiandola surrenale. Studi recenti hanno dimostrato che la molecola stimola la secrezione di glucocorticoidi nelle cellule della corteccia surrenale dell'uomo e del ratto, agendo esclusivamente attraverso il recettore Ox1R (Ziolkowska et al., 2005). Diversi studi hanno confermato la presenza di Ox1R ed Ox2R e dei loro rispettivi mRNA nella corteccia e nel midollo delle ghiandole surrenali (Malendowicz et al., 2001; Mazzocchi et al., 2001; Randeva et al., 2001; Spinazzi et al., 2005 b). E' stato anche dimostrato che l'espressione di entrambi i recettori aumenta negli adenomi rispetto ai livelli di espressione presenti nella corteccia surrenale normale (Spinazzi et al., 2005 b).

Livelli molto elevati di mRNA che codifica per Ox2R (4 volte superiore a quello del cervello) sono presenti nelle ghiandole surrenali dei ratti maschi; l'mRNA di Ox2R è principalmente localizzato nella zona glomerulosa e reticolare. Un ulteriore studio ha confermato che Ox1R è espresso nella corteccia della ghiandola surrenale dell'uomo in condizioni fisiologiche, mentre Ox2R si trova principalmente nel midollo (cellule adrenergiche e noradrenergiche) (Spinazzi et al., 2005 b). Esperimenti di doppia

immunofluorescenza hanno dimostrato che tutte le cellule midollari, cellule adrenergiche e noradrenergiche, esprimono Ox2R (Blanco et al., 2002). I tumori corticali (adenomi corticosurrenali) sono risultati positivi per Ox1R, ma non per Ox2R; i tumori midollari (feocromocitoma), invece, esprimono solo Ox2R (Blanco et al., 2002).

Negli ovini è stato rilevato l'mRNA per Ox1R nel testicolo, nel rene e nella ghiandola surrenale (Zhang et al., 2005). La presenza di recettori per OxA è stata dimostrata in strutture neuronali periferiche collegate con l'apparato gastroenterico: i gangli nodosi, infatti, esprimono Ox1R nell'uomo e nel ratto (Burdyga et al., 2003). Nell'apparato gastroenterico, l'immunoreattività per Ox1R è stata visualizzata in fibre nervose gangliari, nella muscolatura liscia e nella mucosa (Ehrstrom et al., 2005). Immunoreattività per OxA e Ox1R è stata evidenziata nella mucosa, in fibre e corpi cellulari enterici e nella muscolatura circolare dello stomaco (Ehrstrom et al., 2005). Neuroni orexinergici mostrano immunoreattività all'acetilcolina ed un sottoinsieme di questi neuroni contiene VIP. Le cellule enterocromaffini contengono OxA ed esprimono Ox2R, mentre Ox1R è espressa da elementi neuronali dell'intestino (Naslund et al., 2002). I recettori per OxA sono presenti anche a livello dell'epitelio intestinale; infatti Ox1R, ma non Ox2R, è

espresso in cellule tumorali di colon umano, HT29-D4. L'espressione di Ox1R e l'effetto pro-apoptotico dell'OxA sono stati riscontrati in altre linee cellulari tumorali di colon quali le Caco-2, SW480 e LoVo, ma non in cellule normali epiteliali del colon (Rouet- Benzineb et al., 2004).

Le funzioni svolte dalle orexine sono state studiate anche nell'apparato genitale maschile e femminile in cui è stata dimostrata la presenza di OxA (Mitsuma et al., 2000), degli mRNA che codificano per Ox1R, Ox2R (Johren et al., 2001; Karteris et al., 2004) e per la prepro-orexina (Barreiro et al., 2005). Nell'uomo è stato individuato l'mRNA per la prepro-orexina nell'epididimo e nel pene (Karteris et al., 2004), mentre gli mRNA per entrambi i recettori sono stati ritrovati nel testicolo, nell'epididimo, nel pene e nelle vescicole seminali. Nella gonade, in particolare, è stata evidenziata la presenza dei suddetti RNA e proteine in vari citotipi interstiziali e germinali (Karteris et al., 2004). Per quanto riguarda l'apparato genitale femminile Silveyra e coautori (2007) hanno individuato nelle ovaie di ratto entrambi i recettori, ma non la prepro-orexina. L'espressione di recettori funzionali per l'OxA in cellule di Leydig umane suggerisce un ruolo importante dell'OxA nella steroidogenesi (Barreiro et al., 2004; Karteris et al., 2004).

## **2. SCOPO DEL LAVORO DI TESI**

Le orexine ed i loro recettori sembrano svolgere un ruolo determinante nel sistema riproduttivo dei mammiferi (Karteris et al., 2004; Sylveira et al., 2007). Esse esercitano la loro azione sulla riproduzione a livello sia centrale che periferico influenzando, così, l'asse ipotalamo-gonadi (Barreiro et al., 2004; Barreiro et al. 2005). La loro presenza negli organi genitali maschili e femminili di varie specie di mammiferi, incluso l'uomo, suggeriscono un ruolo rilevante delle orexine a livello locale. Il meccanismo d'azione, tuttavia, con cui le orexine regolano la fisiologia della riproduzione non è del tutto chiarito.

Allo scopo di una migliore comprensione del ruolo fisiologico svolto dalle orexine e dai loro recettori nella riproduzione dei mammiferi, il presente lavoro ha avuto lo scopo di valutare l'espressione ed il ruolo dell'OxA e del suo recettore 1 nel complesso uretro-prostatico, nella ghiandola vestibolare, nel testicolo e nell'epididimo di una specie largamente utilizzata a fini sperimentali, il ratto, e di un'altra di indiscusso valore zootecnico, il bovino.

A tal fine sono state effettuate indagini di immunoistochimica per evidenziare la presenza dell'OxA e del recettore Ox1R ed analisi

biochimiche di RT-PCR e Western blotting per rilevare l'espressione degli mRNA codificanti rispettivamente per il precursore dell'OxA, la prepro-orexina, e il recettore Ox1R. I risultati ottenuti sono stati correlati alla presenza negli stessi tessuti di altre sostanze biologicamente attive, quali l'nNOS e la serotonina, con le quali le orexine assai verosimilmente interagiscono per regolare le funzioni riproduttive.

In particolare, le suddette indagini sono state effettuate su tessuti prelevati da organi genitali di bovini di entrambi i sessi e di ratti maschi.

L'apparato genitale maschile è composto dai testicoli, che provvedono alla spermatogenesi ed alla produzione del testosterone. Esso è, inoltre, formato da condotti pari (epididimo, dotti deferenti e condotti eiaculatori) ed impari (uretra pelvica e peniena) per il trasporto dello sperma. Le ghiandole annesse ed il pene, organo dell'accoppiamento, completano i genitali. I testicoli sono contenuti nello scroto e da ciascuno di essi si origina un dotto deferente che sbocca nell'uretra poco oltre il collo vescicale. Applicato al margine dorsale del testicolo si trova il condotto epididimale che svolge la funzione di trasporto e capacitazione degli spermatozoi.

Il testicolo è avvolto da una tonaca fibrosa esterna, l'albuginea, che invia all'interno del parenchima setti connettivali che formano le logge



testicolari. I setti si riuniscono dorsalmente a formare il mediastino. Le logge contengono i tubuli seminiferi contorti e negli spazi intertesticolari le cellule interstiziali o di Leydig. I tubuli sono numerosissimi e tortuosi ed al loro interno avviene la spermatogenesi. Essi confluiscono in una rete tridimensionale, definita “rete testis” da cui si dipartono altri condotti detti duttuli efferenti che, riunendosi, vanno a formare l’epididimo.

L’epididimo decorre tortuosamente sul margine dorsale del testicolo e, quindi, risalendo nella borsa scrotale forma un condotto rettilineo di diametro maggiore: il dotto deferente. Tale dotto risale il funicolo spermatico, attraversa il canale inguinale e sbocca nell’uretra o nel dotto della vescichetta seminale. La spermatogenesi si svolge all’interno dei tubuli seminiferi testicolari. Le cellule che formano l’epitelio germinativo adagiato alla parete dei tubuli sono elementi in corso di differenziazione. La produzione del testosterone, l’ormone sessuale maschile, avviene, invece, nelle cellule interstiziali o di Leydig, situate negli spazi intertubulari. Il testosterone regola la spermatogenesi e lo sviluppo dei caratteri sessuali secondari maschili.

La prostata del bovino consta di due parti: una esterna poco sviluppata, corpo della prostata, ed una diffusa nella mucosa uretrale, porzione disseminata. Il corpo della prostata è costituito da un piccolo lobo ed è disposto sulla superficie dorsale dell’uretra pelvica,

caudalmente alle vescicole seminali. Esso ha uno spessore di 0,5-1,5 cm ed una pari lunghezza. La parte disseminata è ben sviluppata e si estende per una lunghezza che varia dai 7 ai 15 cm circa, in rapporto all'età degli animali. Questa porzione, visibile solo quando si seziona l'uretra, è avvolta dal muscolo uretrale. Il corpo della prostata è avvolto da una capsula connettiva da cui deriva uno stroma abbondante e ricco di cellule muscolari lisce che affonda nella porzione disseminata, formando setti anastomizzati ed incompleti. Il parenchima, o “*substantia glandularis*”, viene suddiviso dai setti in lobuli irregolari che convergono verso l'uretra.

L'uretra è rivestita internamente da un epitelio di transizione, formato da più strati di cellule sovrapposte. Essa è un lungo condotto cilindrico impari e mediano che fa seguito alla vescica urinaria, decresce sulla sinfisi ischio-pubica, si applica ventralmente al pene e lo percorre in tutta la sua lunghezza fino all'apice, ove si apre con il meato urinario esterno. Si possono distinguere in essa due segmenti: uretra pelvica e l'uretra peniena. La struttura dell'uretra pelvica comprende la mucosa, nella cui parte craniale è raccolta la prostata disseminata, uno strato muscolare liscio ed uno strato muscolare striato. L'epitelio dell'uretra peniena ha aspetto variabile, senza perdere mai i caratteri di epitelio stratificato di transizione che presenta nel segmento pelvico. In prossimità del meato urinario l'epitelio

diventa pavimentoso stratificato e continua, all'esterno, con quello che ricopre il glande.

Le due ghiandole vestibolari maggiori del bovino sono comprese nella parete laterale del vestibolo vaginale e localizzate ai lati del meato uretrale esterno. Esse sono parzialmente coperte dal muscolo costrittore vestibolare, hanno forma allungata ed uno spessore di circa 1 cm. Istologicamente esse hanno un aspetto tubulo-alveolare composto e sono suddivise in lobuli da setti di tessuto connettivo denso. Il parenchima ghiandolare è formato da adenomeri e condotti secretori sviluppati negli animali in età pubere. La componente stromale mio-connettivale contiene il sistema vasale emo-linfatico.

### **3. MATERIALI E METODI**

#### **3.1 Reagenti chimici ed anticorpi**

Per lo svolgimento della sperimentazione sono stati utilizzati anticorpi anti-OxA ed anti-Ox1R forniti dalla Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Germany). L'anticorpo monoclonale anti-tubulina è stato fornito dalla Chemicon International Inc. (Temecula, CA, USA), mentre gli anticorpi secondari coniugati con la perossidasi sono stati forniti dalla Sigma-Aldrich (St. Luis, MO, U.S.A.). Gli anticorpi secondari biotinilati e il complesso avidina-biotina sono stati forniti dalla Vector Laboratories (Burlingame, U.S.A.).

La leupeptina, l'aprotinina, la pepstatina, la glicina, il rosso ponceau, l'albumina serica bovina (BSA) sono stati forniti dalla Sigma-Aldrich. Il latte disidratato in polvere è stato fornito dalla Biorad (Milano, Italia), l'acido etilen-diammino-tetracetico (EDTA) dalla Applichem (Napoli, Italia). Il glicerolo, l'ammonio persolfato (APS), la tetra-metil-etilen-diammina (Temed) ed il Tween-20 sono stati forniti dalla Pharmacia Biotech (Uppsala, Svezia). Il Tris-(idrossimetil)-amminometano, il  $\beta$ -mercaptoetanolo, il blu di bromofenolo ed il metanolo sono stati forniti dalla Carlo Erba (Milano, Italia). La membrana di nitrocellulosa Protran è stata fornita dalla

Schlecker & Schnell (Keen, NH, U.S.A). Le lastre di sviluppo ed i reagenti ECL sono stati forniti dalla Amersham Corp. (Little Chalfont, UK), il Triazol dalla Invitrogen (Milano, Italia). I primers sono stati forniti dalla Primm (Milano, Italia) ed i kit per la PCR e l'RT-PCR dalla Promega (Milano, Italia).

### **3.2 Prelievo dei campioni**

Le specie animali utilizzate in questo lavoro di tesi sono il bovino ed il ratto. I campioni tessutali di bovino sono stati prelevati da cinque soggetti maschi e da cinque femmine presso il macello di Afragola (Napoli) dopo la loro macellazione. Tutti gli animali prima della macellazione erano in buono stato di salute e sessualmente maturi. I ratti sono stati forniti dalla Harlan Italy SRL (Udine) e sono stati sacrificati secondo le normative vigenti che tutelano il benessere degli animali da laboratorio. I campioni prelevati sono stati in parte immersi in liquido fissativo e processati ed in parte conservati a -80°C.

### **3.3 Immunoistochimica**

I campioni immersi in liquido di Bouin per 12 ore, sono stati sottoposti a disidratazione alcolica e, quindi, immersi in

metilbenzoato per 48 ore. Trascorso questo periodo di tempo, i campioni sono stati inclusi in Paraplast e tagliati al microtomo in sezioni di 5-6 micron che sono state montate su vetrini copri-oggetto. Le sezioni sono state colorate con la metodica immunoistochimica all'avidina-biotina. La prima fase prevede la sparaffinatura delle sezioni in xilolo e la loro idratazione mediante una serie discendente di alcoli ed acqua distillata. Le sezioni, quindi, sono incubate in acqua ossigenata al 3% per 30 minuti a temperatura ambiente, sottoposte a due lavaggi con PBS per 3 minuti ciascuno e incubate con siero normale di coniglio per 20 minuti a temperatura ambiente. Questa fase si conclude con l'adsorbimento degli anticorpi primari diluiti 1:200 sulle sezioni in camera umida a 4°C per una notte. Il giorno seguente, le sezioni sono sottoposte a due lavaggi con PBS di 3 minuti ciascuno ed incubate con un anticorpo secondario biotinilato diluito 1:50 per 30 minuti a temperatura ambiente. Il passaggio successivo prevede due lavaggi in PBS e l'adsorbimento con il complesso avidina-biotina per 30 minuti a temperatura ambiente. La colorazione finale è stata effettuata mediante la 3-3' diaminobenzidina (DAB) applicata alle sezioni per un tempo variabile da 2 a 10 minuti. Dopo un lavaggio finale in acqua distillata, le sezioni sono state disidratate attraverso una serie ascendente di alcoli, chirificate in xilolo e montate con Eukitt.

### **3.4 Preparazione di omogenati di tessuto**

Ai tessuti prelevati, pesati e sminuzzati in piccoli pezzi, è stato aggiunto un tampone di lisi (5 ml/1,5 g di tessuto) composto da: 50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM NaF, 0,5% acido deossicolico, 0,1% sodio dodecilsolfato (SDS), 1% Nonidet P-40, 1 mM fenilmetilsulfonilfluoruro, 0,1 U/ml aprotinina, 10 µg/ml leupeptina e 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>. I campioni, mantenuti a 4°C, sono stati omogenati con apparecchio Ultraturrax L-407, centrifugati a 13000 rpm per 10 minuti a 4°C e conservati a -80°C fino al momento dell'uso. La quantità di proteine contenute nei campioni omogenati è stata determinata utilizzando il reattivo "Bio-Rad protein assay". L'assorbanza è stata misurata mediante uno spettrofotometro Varian Cary 1 (Varian, Inc., CA, USA) ad una lunghezza d'onda di 595 nm. La concentrazione proteica del campione si ottiene estrapolando il valore di assorbanza del campione in esame da una curva standard ottenuta misurando l'assorbanza di soluzioni di BSA a concentrazione nota.

### **3.5 Elettroforesi SDS-PAGE e Western blotting**

I campioni, contenenti uguali quantità di proteine totali, sono stati dapprima bolliti per 5 minuti in un tampone ("sample buffer")

contenente 50 mmol Tris-HCl, pH 6,8, 2% SDS, 10% glicerolo, 0,1% blu di bromofenolo e 5%  $\beta$ -mercaptoetanololo. E' stato, quindi, effettuato il caricamento dei campioni sul gel di poliacrilammide posto in una cameretta per elettroforesi della Bio-Rad ed immerso nel tampone di corsa costituito da 25 mM Tris, 250 mM glicina, 0,1% SDS, pH 8,3. I campioni da separare sono stati caricati su un gel di impaccamento ("stacking gel") al 4% di poliacrilammide che ha la funzione di impaccare le proteine contenute in ciascun campione in una sottile banda prima che esse entrino nel gel di separazione ("running gel"). Per la rilevazione dell'OxA e di Ox1R è stato utilizzato un "running gel" al 12,5% di poliacrilammide.

Dopo l'elettroforesi SDS-PAGE, le proteine separate sul gel sono state trasferite su filtro di nitrocellulosa usando un apposito apparecchio di trasferimento "trans-blot" Bio-Rad. L'avvenuto trasferimento delle bande proteiche è stato visualizzato mediante colorazione per 10 minuti del filtro di nitrocellulosa con il colorante rosso ponceau. I filtri sono stati saturati mediante incubazione per 1 ora a temperatura ambiente in una soluzione al 5% di latte disidratato in TBS-T 0,1% (150 mmol NaCl, 20 mmol Tris-HCl pH 7,4, Tween-20 0,1%). Dopo il periodo di incubazione, i filtri sono stati lavati in TBS-T ed incubati per 2 ore a temperatura ambiente o per tutta la notte a 4°C con l'anticorpo specifico diluito in TBS-T, in presenza di latte



disidratato al 2,5%. Successivamente sono stati effettuati lavaggi in TBS-T ed un'incubazione per 1 ora con un anticorpo secondario anti-IgG coniugato con perossidasi, diluito 1:3000 in TBS-T, in presenza di latte disidratato al 2,5%. Le proteine oggetto di studio sono state visualizzate mediante un metodo di chemiluminescenza (ECL).

I filtri, una volta visualizzate le proteine mediante ECL, sono stati sottoposti a procedura di “stripping” che ha la funzione di allontanare gli anticorpi (primario e secondario) utilizzati nel precedente blot e consentire l'esecuzione di un nuovo Western blotting sullo stesso filtro al fine di visualizzare una diversa proteina. Lo “stripping” si esegue immergendo il filtro in una soluzione costituita da: 100 mM  $\beta$ -mercaptoetanolo, 2% SDS, 62 mM Tris-HCl, pH 6,8 per 20 minuti a 50-60°C. Il filtro viene lavato abbondantemente con una soluzione tampone e sullo stesso viene effettuato un nuovo Western blotting. La procedura di “stripping” viene utilizzata per dimostrare che la quantità di proteine caricata nei vari canali del gel è la stessa per tutti i canali.

### **3.6 Estrazione di RNA da tessuti**

L'RNA totale è stato estratto dai tessuti, precedentemente congelati a -80°C, utilizzando come reagente il Trizol contenente fenolo e guanidina isotiocianato.

I tessuti sono stati incubati con Trizol (1 ml/100 mg o 1 ml/piastra) per 5 minuti a 30°C e con cloroformio per 3 minuti a 30°C. Sono state ottenute, in seguito a centrifugazione a 14.000 rpm per 15 minuti a 4°C, una fase acquosa e una fase fenolica. La fase acquosa è stata incubata con isopropanolo per 10 minuti a 30°C e successivamente centrifugata a 14.000 rpm per 10 minuti a 4°C. Il pellet di RNA ottenuto è stato lavato con etanolo al 75%, centrifugato a 8.500 rpm per 5 minuti a 4°C e incubato con acqua trattata con dietilpirocarbonato (DEPC) per 10 minuti a 55-60°C.

La quantità di RNA estratto è stata misurata mediante spettrofotometro utilizzando i valori di assorbanza a 260 e 280 nm. Per valutare il grado di purezza dell'RNA estratto il campione ottenuto è stato caricato su un gel di agarosio (1%) - formaldeide in condizioni denaturanti. Gli RNA ribosomiali (18S e 28S) apparivano chiaramente risolti.

### **3.7 RT-PCR**

La reazione a catena della polimerasi con trascrittasi inversa (RT-PCR) viene utilizzata per amplificare DNA a partire da un pool di RNA di un tipo cellulare. La trascrizione inversa genera una copia del filamento di RNA sotto forma di filamento di DNA complementare

(cDNA). Tale filamento costituisce il substrato per l'amplificazione nella PCR. La RT-PCR comprende due tappe fondamentali: la retrotrascrizione dell'RNA e l'amplificazione del cDNA ottenuto con la retrotrascrizione. Nella prima fase della trascrizione inversa, primers non specifici o "random examers", che consistono in piccoli oligonucleotidi, ibridizzano con l'RNA bersaglio e vengono estesi dall'enzima trascrittasi inversa dando origine a numerosi filamenti di cDNA.

Per la nostra sperimentazione, il cDNA è stato sintetizzato a partire da 5 µg di RNA in un volume di 5 µl di acqua sterile e "random examer". Questa miscela è stata incubata a 70°C per 5 minuti e a 4°C per 5 minuti. Nel frattempo, è stata preparata una miscela di reazione contenente: un tampone di reazione 5x, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM dNTP, inibitore di RNAsi e enzima ImProm II Reverse Transcriptase, in un volume finale di 15 µl di H<sub>2</sub>O-DEPC. La miscela contenente l'RNA e la miscela di reazione sono state unite e incubate per 5 minuti a -20°C, per 1 ora a 42°C e per 15 minuti a 70°C. Il cDNA ottenuto è stato conservato a -20°C.

Sono state condotte differenti reazioni di PCR usando i seguenti specifici primers per il bovino:

- prepro-orexina:

5'-ATCCTTCCTCTACAAAGGTCTCC-3'(senso),

5'-CTTGCCCAGCGTGAGGAT-3' (antisenso);

- recettore Ox1R:

5'-AGGCTGCGGTCATGGAAT-3' (senso),

5'-TTCCTGACCAGGGCTGAC-3' (antisenso);

-  $\beta$ -actina:

5'-GGCACCCAGCACAATGAAGAT-3' (senso),

5'-CCTTCACCGTTCCAGTTTTTA-3' (antisenso).

Per il ratto, invece, è stata utilizzata una seconda serie di primers specifici:

- prepro-orexina:

5'-ATCCTTCCTCTACAAAGGTCTCC-3' (senso),

5'-CTTGCCCAGCGTGAGGAT-3' (antisenso);

- recettore Ox1R:

5'-AGGCTGCGGTCATGGAAT-3' (senso),

5'-TTCCTGACCAGGGCTGAC-3' (antisenso);

-  $\beta$ -actina:

5'-GAGGCTCAGAGCAAGAGAGG (senso),

5'-TGACATCTCGCACAATCTCC-3' (antisenso).

Per l'amplificazione della prepro-orexina e dell'Ox1R, la PCR è stata effettuata usando 10  $\mu$ l di cDNA a cui è stato aggiunto un tampone 10x privo di Mg, dNTP 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 50 mM, la miscela

dei primers (10  $\mu$ M) e la DNA polimerasi Platinum Taq, in un volume finale di 50  $\mu$ l. Il programma di amplificazione utilizzato ha previsto un'iniziale denaturazione per 2 minuti a 94°C, seguita da 35 cicli di denaturazione per 1 minuto a 94°C, "annealing" per 1 minuto a 56°C e un'estensione per 1 minuto a 72°C. Quale controllo interno per l'RT-PCR e l'efficienza di reazione della PCR è stata condotta in parallelo l'amplificazione della  $\beta$ -actina. Il prodotto di PCR è stato visualizzato elettroforeticamente su un gel di agarosio al 2% in presenza di bromuro di etidio. I prodotti di PCR sono stati estratti dal gel, purificati e sequenziati.

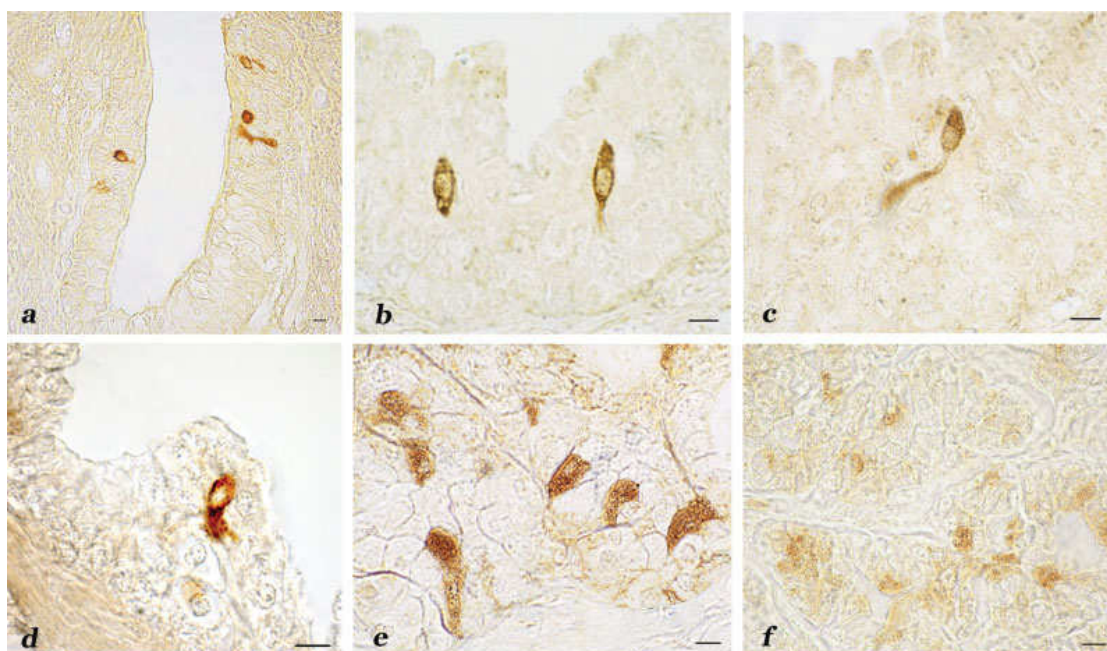
## **4. RISULTATI**

### **4.1 Localizzazione di OxA e Ox1R nel complesso uretro-prostatico del bovino: analisi immunoistochimica**

I primi risultati di questo lavoro di ricerca hanno riguardato la valutazione dell'espressione dell'OxA e del suo recettore Ox1R in campioni di uretra e di prostata bovina. Questi tessuti sono stati analizzati mediante immunoistochimica, Western blotting e RT-PCR.

In Figura 6 è riportata la distribuzione dell'OxA (pannello A) e del recettore Ox1R (pannello B) nei tessuti di prostata bovina evidenziata mediante analisi immunoistochimica. In particolare, sono state rilevate cellule immuno-positive per il peptide sia nell'uretra che nella prostata, mentre cellule immuno-positive per il recettore risultano presenti solo nella prostata. Le prime hanno la tipica morfologia delle cellule definite “neuroendocrine” (NE) in grado di produrre peptidi biologicamente attivi ed ammine biogene. Le cellule appaiono allungate per la presenza di sottili propaggini citoplasmatiche rivolte verso la membrana basale o il lume. Le cellule prostatiche immunopositive per OxA e Ox1R risultano molto più numerose delle precedenti ed appartengono al normale citotipo esocrino che costituisce gran parte del parenchima ghiandolare.

**Figura 6**



**Analisi immunoistochimica per OxA ed Ox1R su tessuti di prostata bovina.** Materiale granulare contenuto nel citoplasma di cellule esocrine del parenchima prostatico mostra immunopositività per OxA (**a, b, c, d, e**) e Ox1R (**f**). Metodica immunoistochimica all'avidina-biotina e colorazione mediante 3-3'-diaminobenzidina (DAB). Barre micrometriche: 10  $\mu$ m.

## **4.2 Espressione della prepro-orexina e di Ox1R nel complesso uretro-prostatico del bovino: analisi biochimiche**

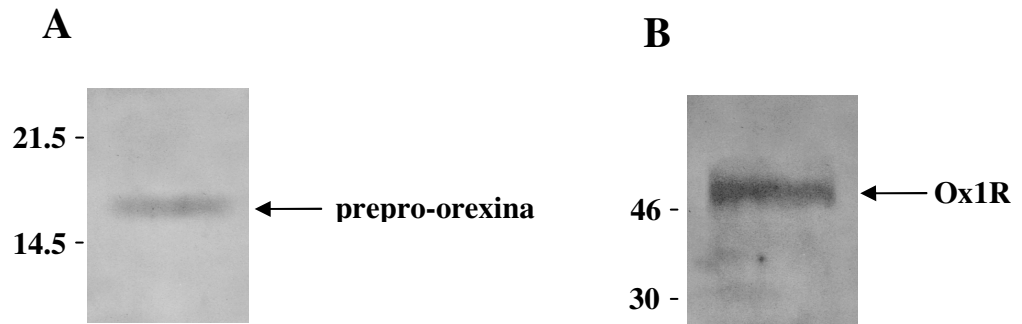
Mediante analisi di Western blotting è stata evidenziata la presenza della prepro-orexina e del recettore Ox1R nella prostata bovina. In Figura 7 è riportato il profilo elettroforetico di campioni di prostata bovina da cui si evidenziano una banda relativa ad una proteina con peso molecolare di circa 16 KDa corrispondente alla prepro-orexina (Pannello A) ed una banda relativa ad una proteina di peso molecolare di circa 50 KDa corrispondente al recettore Ox1R (Pannello B).

L'analisi mediante RT-PCR ha evidenziato nel tessuto di prostata l'espressione dell'mRNA che codifica per la prepro-orexina (Figura 8, pannello A, canale 2) e l'espressione dell'mRNA che codifica per Ox1R (Figura 8, pannello B, canale 2). In particolare, i prodotti di PCR corrispondenti sono risultati costituiti da 200 coppie di basi per la prepro-orexina e 300 coppie di basi per Ox1R.

I risultati su riportati forniscono, a tutt'oggi, la prima evidenza della presenza dell'OxA e del recettore Ox1R nel sistema uretro-prostatico del bovino.

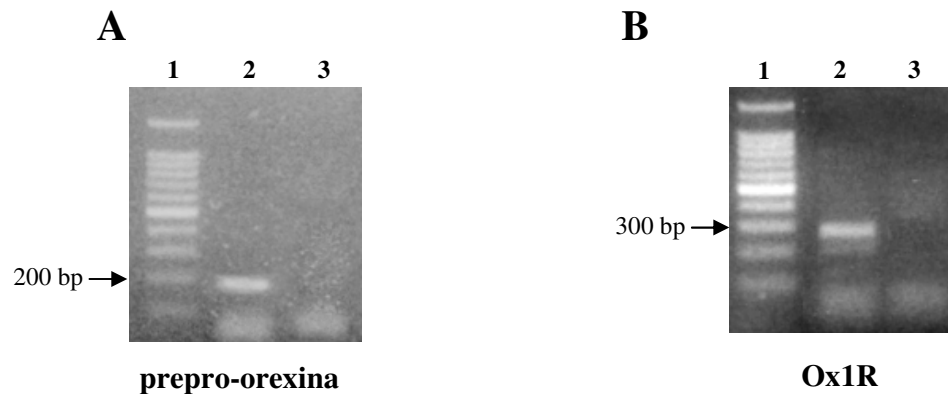


**Figura 7**



**Analisi mediante Western blotting dell'espressione della prepro-orexina e di Ox1R nei tessuti di prostata bovina.** Le bande indicano la presenza nella prostata della prepro-orexina (A) con una massa molecolare di 16 kDa e di Ox1R (B) con una massa molecolare di 50 kDa.

**Figura 8**

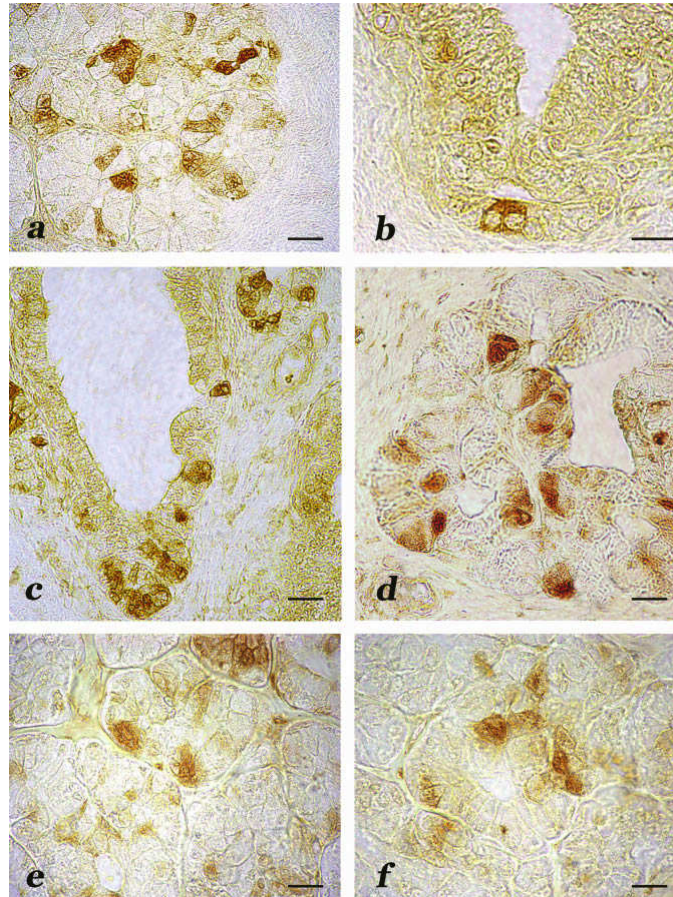


**Analisi mediante RT-PCR dell'mRNA che codifica per la prepro-orexina e per il recettore Ox1R nei tessuti di prostata bovina.** Le bande indicano la presenza nella prostata bovina di trascritti di mRNA di 200 bp per la prepro-orexina (canale 2, pannello A) e 300 bp per Ox1R (canale 2, pannello B). Il canale 1 corrisponde ai markers di DNA a peso molecolare noti e il canale 3 al controllo negativo (acqua distillata).

### **4.3 Localizzazione di OxA e Ox1R nella ghiandola vestibolare del bovino: analisi immunoistochimica**

Successivamente, è stata analizzata l'espressione di OxA e del suo recettore Ox1R nella ghiandola vestibolare del bovino. Essa è considerata l'analogo femminile della ghiandola prostatica per la localizzazione periuretrale e per la presenza in entrambi i tessuti di cellule NE che influenzano l'attività di tessuti adiacenti e/o bersagli distanti tramite i loro prodotti di secrezione (ammine biogene e peptidi ormonali). Come già osservato nella prostata, anche in questa ghiandola l'epitelio esocrino mostra la presenza di cellule immunopositive per Oxa e Ox1R (Figura 9). Le cellule immunopositive appaiono numerose e diffuse nell'epitelio degli adenomeri e dei condotti escretori. La colorazione di intensità variabile presenta una localizzazione citoplasmatica.

**Figura 9**



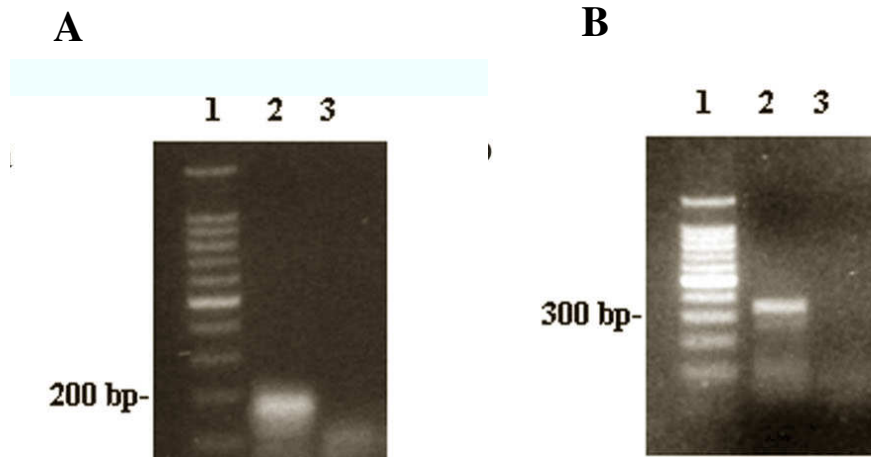
**Analisi immunoistochimica per OxA ed Ox1R su sezioni di ghiandola vestibolare bovina.** a) Cellule contenenti OxA appartenenti ad adenomeri ghiandolari adiacenti sono riunite in piccoli gruppi composti da elementi isolati. b, c) Cellule positive per OxA contenute nei dotti escretori dell'epitelio ghiandolare (b) e in un piccolo diverticolo della parete di uno di loro (c). d, e, f) Il materiale Ox1R-immunopositivo presente in piccoli gruppi di cellule acinose mostra una colorazione di intensità variabile, fine forma granulare e localizzazione citoplasmatica. Metodica immunoistochimica all'avidina-biotina e colorazione mediante 3-3'-diaminobenzidina (DAB). Barre micrometriche: 10  $\mu$ m.

#### **4.4 Espressione della prepro-orexina e di Ox1R nella ghiandola vestibolare del bovino: analisi biochimiche**

Mediante analisi di RT-PCR è stata evidenziata l'espressione dell'mRNA che codifica per la prepro-orexina e per il recettore Ox1R (Figura 10). In particolare, i prodotti della PCR corrispondenti sono risultati costituiti da 200 coppie di basi per la prepro-orexina (Pannello A, canale 2) e 300 coppie di basi per il recettore Ox1R (Pannello B, canale 2).

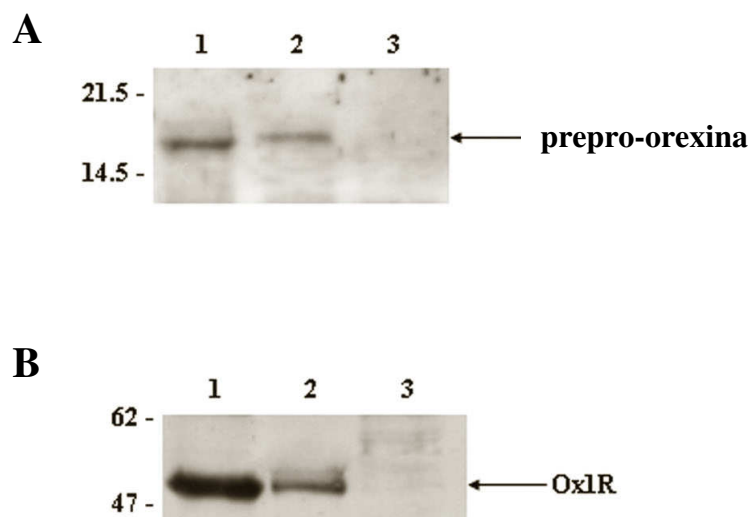
L'espressione delle due proteine presenti nella ghiandola vestibolare è stata confermata mediante analisi di Western blotting. In particolare, si evidenzia, in figura 11, una banda relativa ad una proteina con peso molecolare di circa 16 kDa corrispondente alla prepro-orexina (Pannello A, canale 2) ed una banda con peso molecolare di circa 50 kDa corrispondente al recettore Ox1R (Pannello B, canale 2).

**Figura 10**



**Analisi mediante RT-PCR dell'mRNA che codifica per la prepro-orexina e per il recettore Ox1R nelle ghiandole vestibolari del bovino.** Le bande indicano la presenza nelle ghiandole vestibolari di trascritti di mRNA di 200 bp per la prepro-orexina (canale 2, pannello A) e 300 bp per Ox1R (canale 2, pannello B). Il canale 1 corrisponde ai markers di DNA a peso molecolare noti e il canale 3 al controllo negativo (acqua distillata).

**Figura 11**



**Analisi mediante Western Blotting dell'espressione della prepro-orexina e di Ox1R nella ghiandola vestibolare bovina.** Le bande indicano la presenza nelle ghiandole vestibolari della prepro-orexina con una massa molecolare di 16 kDa (**A**) e di Ox1R con una massa molecolare di 50 kDa (**B**). Il canale 1 corrisponde all'omogenato di cervello di topo (controllo positivo), il canale 2 all'omogenato di ghiandola vestibolare, il canale 3 al controllo negativo (acqua distillata).

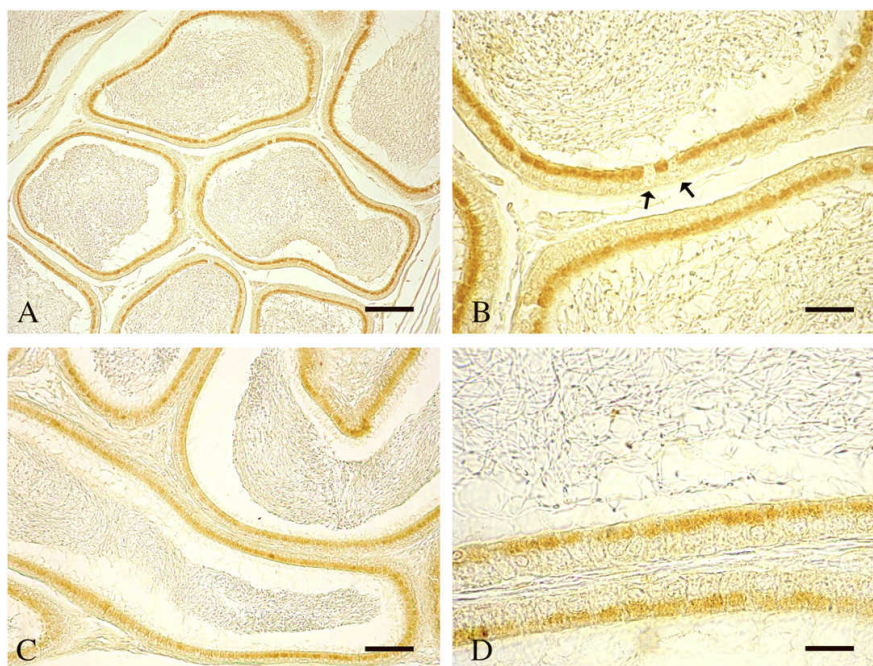
#### **4.5 Localizzazione di OxA e Ox1R nell'epididimo di ratto: analisi immunoistochimica**

La seconda parte dello studio ha riguardato la valutazione dell'espressione dell'OxA e dell'Ox1R nell'epididimo e nel testicolo di ratto.

Nell'epididimo di ratto l'analisi immunoistochimica ha evidenziato la localizzazione dell'OxA e dell'Ox1R nelle cellule che formano l'epitelio di rivestimento della porzione caudale dell'epididimo (Figura 12). Tali cellule, appartenenti al citotipo principale, appaiono numerose in alcune zone della porzione caudale, lungo il profilo circolare dei tubuli regolarmente allineate e sono intervallate da poche cellule negative isolate. Il materiale positivo mostra aspetto finemente granulare con localizzazione sopranucleare citoplasmatica, e spesso riempie interamente la porzione apicale delle cellule. Nessuna immunoreattività per OxA ed Ox1R è stata osservata nelle cellule corrispondenti a citotipi differenti da quello principale, quali le cellule basali, apicali e le cellule chiare.



**Figura 12**



**Analisi immunoistochimica per OxA e Ox1R nell'epididimo di ratto.** OxA (A, B) e Ox1R (C, D) sono localizzati nelle cellule principali di alcune zone dell'epididimo e mostrano una localizzazione citoplasmatica apicale. **B)** La sequenza di cellule epiteliali positive è interrotta dalla presenza di due cellule negative (freccette) corrispondenti al citotipo chiaro. Metodica immunoistochimica con avidina-biotina e colorazione mediante 3-3'-diaminobenzidina (DAB). Barre micrometriche: 10 µm.



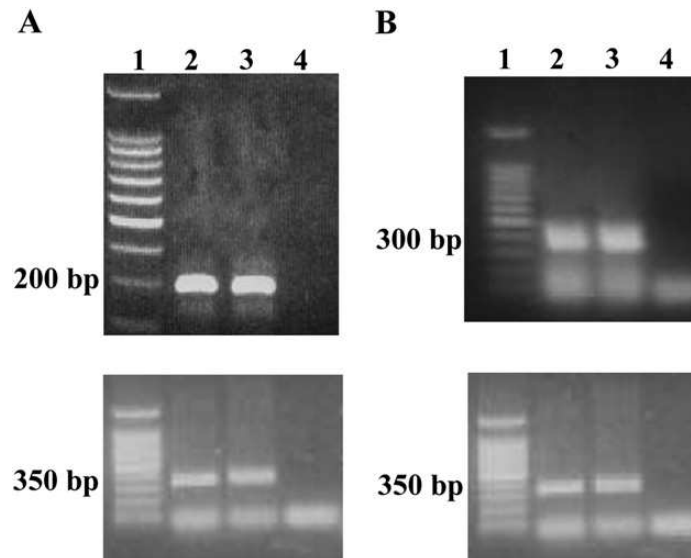
#### **4.6 Espressione della prepro-orexina e di Ox1R nell'epididimo di ratto: analisi biochimiche**

E' stata, quindi, analizzata mediante RT-PCR l'espressione dell'mRNA che codifica per la prepro-orexina e per Ox1R (Figura 13). Tale analisi ha portato all'amplificazione di specifici frammenti di DNA di 200 paia di basi per la prepro-orexina (Pannello A, canale 3) e di 300 paia di basi per Ox1R (Pannello B, canale 3) in campioni di epididimo di ratto. Tale dato dimostra che l'epididimo è in grado di sintetizzare la prepro-orexina e Ox1R.

Nell'epididimo di ratto la presenza di entrambe le proteine è stata confermata mediante Western blotting (Figura 14). In particolare, è stata evidenziata una banda di massa molecolare di 16 kDa per la prepro-orexina (Pannello A, canale 2) e una banda di massa molecolare di 50 kDa per Ox1R (Pannello B, canale 2).

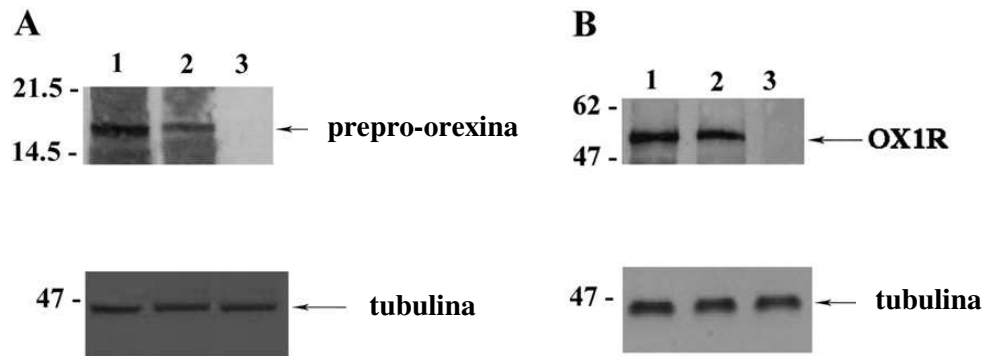
Questi risultati forniscono la prima evidenza dell'immunoreattività per OxA ed Ox1R nelle cellule principali dell'epididimo. Sebbene non si possa escludere la possibilità che l'OxA presente nell'epididimo giunga in maniera sistemica, la presenza nell'organo dell'mRNA codificante per la prepro-orexina ed il recettore Ox1R indica che l'OxA possa essere sintetizzata anche a livello locale.

**Figura 13**



**Analisi mediante RT-PCR dell'mRNA che codifica per la prepro-orexina e per Ox1R nell'epididimo di ratto.** Le bande indicano la presenza nell'epididimo di trascritti di mRNA di 200 bp per la prepro-orexina (canale 3, pannello A) e 300 bp per Ox1R (canale 3, pannello B). Il canale 1 corrisponde ai markers di DNA a peso molecolare noti, il canale 2 al controllo positivo (cervello di ratto) e il canale 4 al controllo negativo (acqua distillata). Nei pannelli in basso è mostrata l'espressione del trascritto per la  $\beta$ -actina, usata come controllo interno.

**Figura 14**

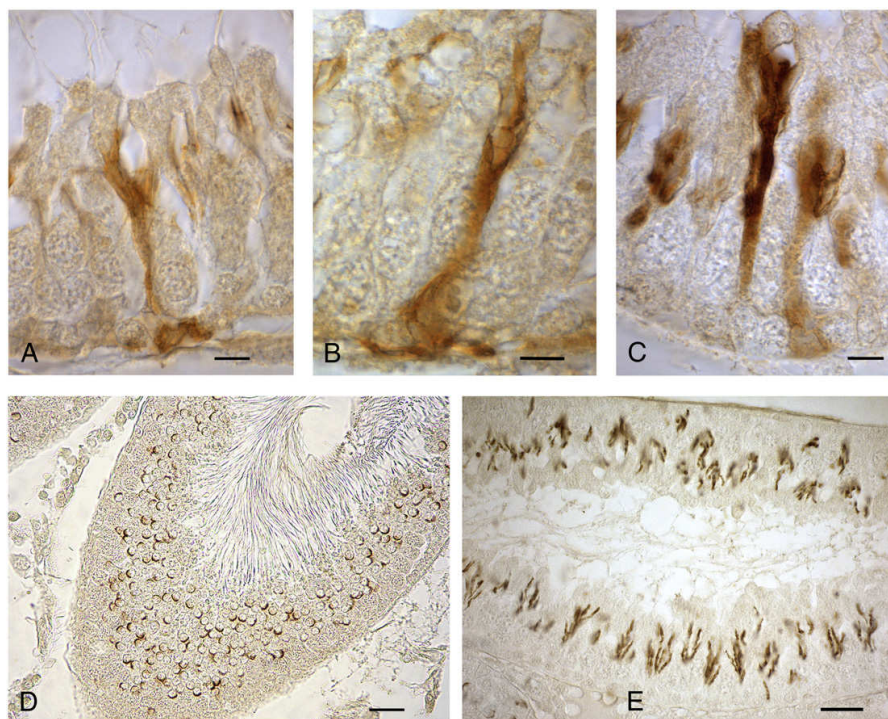


**Analisi mediante Western blotting dell'espressione della prepro-orexina e Ox1R nell'epididimo di ratto.** Le bande indicano la presenza nell'epididimo della prepro-orexina con una massa molecolare di 16 kDa (A) e di Ox1R con una massa molecolare di 50 kDa (B). Il canale 1 corrisponde all'omogenato di cervello di topo (controllo positivo), il canale 2 all'omogenato di epididimo di ratto, il canale 3 al controllo negativo (acqua distillata). Per dimostrare che la quantità di proteine caricata nei vari canali del gel è la stessa per tutti i canali, gli stessi blots sono stati strappati e reincubati con un anticorpo monoclonale anti-tubulina (pannelli A e B inferiori).

#### **4.7 Localizzazione di OxA nel testicolo di ratto: analisi immunoistochimica**

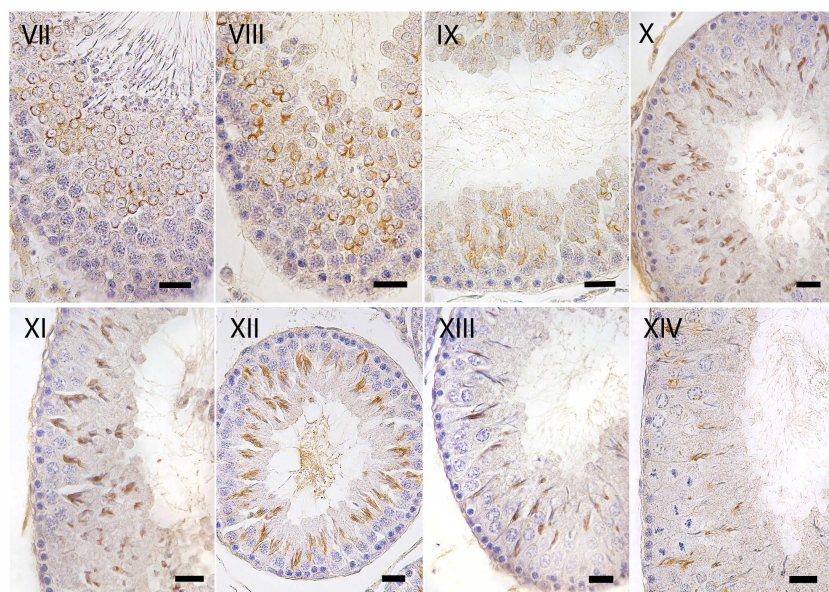
In campioni di testicolo di ratto, l'immunoreattività ad OxA è stata rilevata selettivamente nelle cellule del Sertoli e negli spermatidi sia tondi che allungati (Figura 15). Le cellule del Sertoli positive sono state ben evidenziate in sezioni trasversali di tubuli seminiferi. Esse mostrano reattività granulare localizzata generalmente alla base del citoplasma che spesso si estende verso l'apice, in modo da rendere visibile l'intero profilo e la forma irregolare delle Sertoli. Gli spermatidi tondi ed allungati contenenti OxA sono risultati molto più numerosi rispetto alle cellule del Sertoli positive, e la loro immunoreattività è sempre localizzata a livello del complesso acrosomiale. Un esame accurato delle sezioni contrastate con ematossilina ha rivelato la presenza di spermatidi positivi nelle fasi del ciclo dell'epitelio germinale che vanno dal VII al XIV stadio (Figura 16).

**Figura 15**



**Analisi immunoistochimica per OxA nel testicolo di ratto. (A, B, C)** Cellule di Sertoli contenenti OxA si elevano dalla membrana del tubulo verso il lume e si alternano a cellule germinali. **(D, E)** Spermatidi rotondi **(D)** e allungati **(E)** sono intensamente colorati dall'anticorpo anti-OxA. Metodica immunoistochimica all'avidina-biotina e colorazione mediante 3-3'-diaminobenzidina (DAB). Barre micrometriche: 20 µm **(A, B, C)** e 10 µm **(D, E)**.

**Figura 16**

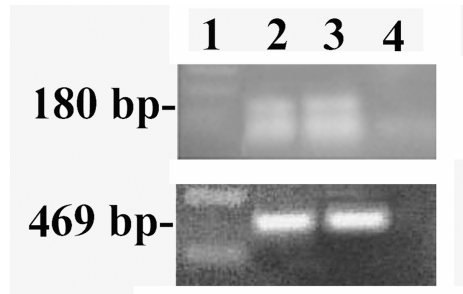


**Analisi immunoistochimica per OxA nel testicolo di ratto con riferimento alle fasi progressive del ciclo evolutivo dell'epitelio germinale.** Diverse forme di spermatidi intensamente positivi caratterizzano il passaggio dalla VII alla XIV fase del ciclo. Metodica immunoistochimica all'avidina-biotina con contrasto di ematossilina. Barre micrometriche: 20 μm.

#### **4.8 Espressione della prepro-orexina nel testicolo di ratto: analisi biochimiche**

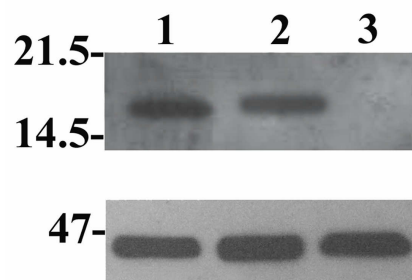
Mediante analisi di RT-PCR è stata valutata l'espressione dell'mRNA che codifica per la prepro-orexina. Il prodotto di PCR corrispondente è risultato costituito da un frammento di 180 paia di basi specifico per la prepro-orexina (Figura 17, pannello A, canale 3). La presenza della prepro-orexina nel testicolo di ratto è stata confermata mediante analisi di Western blotting (Figura 18) in cui è stata evidenziata una proteina con peso molecolare di 16 kDa corrispondente alla prepro-orexina (Pannello A, canale 2).

**Figura 17**



**Analisi mediante RT-PCR dell'mRNA che codifica per la prepro-orexina nel testicolo di ratto.** Le bande indicano la presenza nel testicolo di trascritti di mRNA per la prepro-orexina di 180 bp (canale 3). Il canale 1 corrisponde ai markers di DNA a peso molecolare noti, il canale 2 al controllo positivo (cervello di ratto) e il canale 4 al controllo negativo (acqua distillata). Nel pannello in basso è mostrata l'espressione del trascritto per la  $\beta$ -actina, usata come controllo interno.

**Figura 18**



**Analisi di Western blotting per l'espressione della prepro-orexina nel testicolo di ratto.** Le bande indicano la presenza nel testicolo della prepro-orexina con una massa molecolare di 16 kDa. Il canale 1 corrisponde all'omogenato di cervello di topo (controllo positivo), il canale 2 all'omogenato di testicolo di ratto, il canale 3 al controllo negativo (acqua distillata). Per dimostrare che la quantità di proteine caricata nei vari canali del gel è la stessa per tutti i canali, lo stesso blot è stato strappato e reincubato con un anticorpo monoclonale anti-tubulina (pannello inferiore).



## 5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

In questo lavoro di tesi è stata evidenziata per la prima volta l'espressione dell'OxA e del recettore Ox1R nel complesso uretro-prostatico del bovino. E' stato dimostrato, inoltre, che il neuropeptide ed il suo recettore sono sintetizzati localmente, indicando ciò che l'OxA svolge un ruolo determinante nella normale funzionamento e nelle patologie di tale complesso. In particolare, l'OxA, ma non il suo recettore, è stata ritrovata in una piccola popolazione di cellule NE dell'uretra.

La cellule NE, che producono ammine biogene e/o peptidi ormonali, sono sparse nella mucosa degli organi o negli epiteli ghiandolari. Esse sono considerate cellule recettoriali-secretorie in grado di ricevere stimoli meccanici e/o chimici dalla loro estremità luminale e di rispondere rilasciando i loro secreti attraverso l'opposta estremità orientata verso le cellule esocrine adiacenti o i capillari sottoepiteliali (Yui et al., 1988). In particolare, le cellule NE dell'epitelio uretrale, particolarmente numerose a livello del collicolo seminale di molti mammiferi, costituiscono una vera e propria fonte di ormoni genitali (Hanyu et al., 1987; Vittoria et al., 1990; Vittoria et al., 1992). Le cellule NE del complesso uretro-prostatico del bovino e

degli ovini contengono cromogranina A, serotonina, somatostatina, colecistochinia ed alcuni fattori di crescita (Vittoria et al., 1990; Arrighi et al., 2004).

I risultati della nostra analisi immunoistochimica sul complesso uretro-prostatico di bovino che dimostrano la presenza di OxA in una piccola sottopopolazione di cellule NE uretrali supportano l'ipotesi che le cellule NE che producono OxA rilasciano il peptide verso le cellule esocrine adiacenti e/o ai capillari sanguigni sottoepiteliali, mediante secrezione paracrina o endocrina. Le vescicole seminali, il pene, l'epididimo ed il testicolo, in cui sono stati riscontrati i recettori per l'OxA e/o i loro rispettivi mRNA, potrebbero essere bersagli dell'OxA prodotta in tale complesso (Ohkubo et al., 2003; Karteris et al., 2004; Barreiro et al., 2005; Zhang et al., 2005).

Cellule NE contenenti OxA sono state anche descritte nell'apparato gastroenterico e nel pancreas di diversi mammiferi, uomo compreso (Kirchgessner e Liu, 1999; Ehrstrom et al., 2005). In particolare, esse sono localizzate nello stomaco, nell'intestino tenue e crasso e nelle isole pancreatiche e, spesso, risultano contenere anche gastrina, serotonina o insulina.

Le funzioni esercitate dall'OxA, prodotta dalle cellule NE, comprendono la stimolazione della secrezione intestinale dopo un pasto, l'attivazione di neuroni primari afferenti e la modulazione degli

effetti dell'insulina sull'assunzione di cibo e/o sul metabolismo del glucosio.

Le nostre indagini di immunoistochimica hanno anche mostrato la presenza di OxA e di Ox1R nell'epitelio esocrino della prostata bovina. L'analisi di RT-PCR volta a valutare l'espressione dei geni che codificano per la prepro-orexina e l'Ox1R ha dimostrato la presenza dei trascritti di mRNA per entrambe queste proteine nel complesso uretro-prostatico del bovino. La presenza delle due proteine è stata confermata anche mediante analisi di Western blotting. I pesi molecolari della prepro-orexina (16 kDa) e dell'Ox1R (50 kDa), rilevati nel nostro studio, sono comparabili a quelli delle stesse sostanze localizzate in altri tessuti di diverse specie di mammiferi (Karteris et al., 2004). In particolare, l'espressione dell'OxA e del suo recettore è stata evidenziata anche nella prostata di un altro ruminante, il bufalo *Bubalus bubalis* (dati non riportati).

La funzione svolta dall'OxA nel complesso uretroprostatico di bovino al momento è sconosciuta. L'OxA stimola la sintesi di catecolammine dalle ghiandole surrenali della stessa specie attraverso l'attivazione della proteina chinasi C mediata dalla tirosina idrossilasi (Kawada et al., 2003). Studi *in vitro* hanno mostrato che le orexine modulano la crescita delle cellule corticosurrenali del ratto, esercitando effetti proliferativi e anti-proliferativi mediati da Ox1R ed Ox2R,

rispettivamente (Spinazzi et al., 2005 a). Al contrario, le orexine, agendo mediante l'Ox1R, inibiscono la crescita e inducono apoptosi in linee cellulari derivate da cancro del colon e da neuroblastoma umani (Rouet-Benzineb et al., 2004). Alla luce di tali evidenze, l'identificazione di OxA nel complesso ureto-prostatico del bovino lascia supporre che il peptide sia sintetizzato ed utilizzato localmente o diffuso verso organi-bersaglio vicini, giocando in tal modo un ruolo fondamentale sia negli stati fisiologici che patologici del tratto genitale.

Nell'apparato genitale femminile, le ghiandole vestibolari contengono, come la prostata maschile, cellule NE in grado di influenzare l'attività di tessuti adiacenti e/o distanti secernendo ammine biogene e peptidi con attività ormonale (Abrahamsson and di Sant'Agnese, 1993; Czaja et al., 1996; Warner et al., 1996;. Slone et al., 1999. Russo e Vittoria, 2006). Queste cellule rappresentano una sottopopolazione cellulare nel compartimento epiteliale delle ghiandole vestibolari, ma il loro numero aumenta nel caso di disfunzione neoplastica carcinomatosa del parenchima ghiandolare. Tali tipi di neoplasie sono caratterizzati da una prognosi infausta (Helpap et al., 1999; Obermair et al., 2001).

In questo lavoro di tesi è stata valutata l'espressione dell'OxA e del suo recettore Ox1R nelle ghiandole vestibolari del bovino. L'analisi

immunoistochimica ha evidenziato la presenza delle due proteine nei componenti dell'epitelio esocrino delle ghiandole. L'analisi di RT-PCR volta a valutare l'espressione dei geni che codificano per la prepro-orexina e l'Ox1R ha dimostrato la presenza dei trascritti di mRNA per entrambe queste proteine nel tessuto ghiandolare. La presenza delle due proteine è stata confermata anche mediante analisi di Western blotting.

La maggior parte delle cellule NE vestibolari e prostatiche del bovino e di altre specie di mammiferi contiene l'ammina biogena serotonina (Slone et al., 1999; Russo and Vittoria, 2006). La coesistenza di serotonina e OxA, sostanze probabilmente coinvolte nella regolazione di alcune funzioni genitali, è stata dimostrata in cellule endocrine e/o muscolari di altri organi di mammiferi (Muraki et al., 2004; Wang et al., 2005; Tao et al., 2006). L'intestino umano contiene cellule NE che elaborano contemporaneamente serotonina e OxA, e la funzione attribuita al peptide sarebbe quella di stimolare neuroni afferenti primari metasimpatici (Kirchgessner and Liu, 1999). Serotonina e OxA sono stati ritrovate, inoltre, nelle cellule di Leydig di criceto (Frungieri et al., 1999) e nel testicolo di ratto (Barreiro et al., 2005), dove regolano la steroidogenesi attraverso un meccanismo di azione probabilmente antagonistico.

L'attività fisiologica dell'OxA nell'apparato genitale femminile è quasi del tutto ignota. Nel ratto l'OxA potrebbe avere come bersaglio funzionale l'ovaio su cui potrebbe agire sia indirettamente, attraverso l'asse ipotalamo-ipofisario, sia direttamente. L'ovaio, infatti, contiene entrambi i recettori per le orexine (Silveyra et al., 2007). In particolare, un incremento dell'espressione di Ox1R e Ox2R nell'ovaio è concomitante al rilascio ipofisario dell'ormone luteinizzante (LH), dell'ormone follicolo-stimolante (FSH) e della prolattina (PRL) nel tardo pomeriggio del giorno del proestro. Recettori antagonisti dell'OxA riducono le gonadotropine nel proestro e/o l'ovulazione nella fase estrale del ciclo sessuale di ratto (Silveyra et al., 2007).

Sebbene ulteriori studi siano necessari per valutare il ruolo esercitato da OxA e Ox1R nell'apparato genitale femminile di mammiferi, i risultati ottenuti nel corso della presente tesi forniscono la prima evidenza dell'esistenza dei due peptidi nelle ghiandole vestibolari di bovino. Essi potrebbero essere coinvolti nella secrezione di sostanze endocrine o non, da parte dell'epitelio ghiandolare.

Il nostro studio ha evidenziato la presenza dell'OxA e del recettore OxR1 anche nell'epidimo di ratto, mettendo così in evidenza un ulteriore sito di azione del neuropeptide nel controllo dell'asse riproduttivo maschile dei mammiferi.

L'OxA e l'Ox1R qui riscontrati nel genitale di bovino e di ratto risultano simili alle analoghe proteine presenti nel cervello o in altri tessuti dei mammiferi (Sakurai et al., 1998; de Lecea et al., 1998; Johren et al., 2001; Barreiro et al., 2005; Russo et al., 2008; Pavone et al., 2009). L'importanza biologica di questi peptidi nel tratto genitale dei mammiferi si basa sul fatto che essi sono probabilmente elaborati e secreti da citotipi genitali. Le cellule NE dell'epitelio uretrale e le cellule di Sertoli del testicolo potrebbero, infatti, essere fonte di entrambi (Barreiro et al., 2004). Lo stesso può dirsi, sulla base dei risultati qui ottenuti, per le cellule principali della porzione caudale dell'epididimo. Come è noto queste ultime sono deputate al trasporto di elettroliti ed acqua ed all'elaborazione e secrezione di varie sostanze determinando la formazione di un ambiente intratubulare in cui gli spermatozoi acquistano capacità fecondante e motilità (Wong et al., 2001). Sostanze bioattive, quali la secretina ed il peptide pituitario attivante l'adenilato ciclasi (PACAP) (Zhou et al., 1997), hanno un ruolo fondamentale nel controllo del trasporto di elettroliti nell'epididimo. Analogamente a tali sostanze anche il peptide OxA, espresso nei citotipi principali dell'epididimo, mostra una localizzazione apicale nel citoplasma di queste cellule, si lega a recettori accoppiati alle proteine G e potrebbe, quindi, svolgere un

ruolo analogo nel controllo del trasporto trans-epiteliale di elettroliti e fluidi nel tubulo epididimale.

Per completare il nostro studio volto a valutare la presenza e il ruolo dell'OxA nell'apparato genitale dei mammiferi, abbiamo analizzato campioni di testicolo di ratto.

In un precedente lavoro era stata rilevata immunoreattività ad OxA nelle cellule di Leydig e negli spermatociti del testicolo del ratto e, funzionalmente, un incremento della secrezione di testosterone *in vitro* in presenza del peptide (Barreiro et al., 2004; Barreiro et al., 2005). Nel corso di questo studio è stata dimostrata l'esistenza di OxA in due citotipi differenti del testicolo, quali le cellule di Sertoli e gli spermatidi. Viene così confermata l'ipotesi che la fonte principale di OxA nel testicolo sia localizzata nel comparto tubulare più che in quello interstiziale (Barreiro et al., 2005). Le cellule del Sertoli rappresenterebbero, quindi, la fonte principale di OxA nel testicolo dei mammiferi.

La positività ad OxA negli spermatociti è stata dimostrata nell'intero ciclo evolutivo dell'epitelio germinativo, con l'eccezione della V e VI fase (Barreiro et al., 2005). In questo lavoro è stata osservata la presenza di spermatidi positivi al peptide solo nella seconda metà del ciclo, precisamente dalla VII alla XIV fase. Il rapido turn-over dell'OxA potrebbe essere una probabile spiegazione delle



differenze osservate. E' probabile, infatti, che le sostanze che costituiscono la costellazione endocrina del testicolo, testosterone escluso, siano sintetizzate in aree ristrette dell'organo, per breve tempo ed in seguito a stimolazione di sostanze-segnale. Nell'epididimo di ratto, i due peptidi sono stati ritrovati solo in alcune aree della cauda e non in tutti i soggetti esaminati (Tafari et al., 2009).

Nel comparto tubulare del testicolo di ratto, l'OxA prodotta dalle cellule del Sertoli agisce in modo autocrino, bloccando la produzione da parte di dette cellule di due sostanze: l'inibitore della sostanza mulleriana (MIS), che ha, in condizioni basali, un'azione steroidolitica sulle cellule di Leydig, e lo Stem Cell Factor (SCF) che stimola la proliferazione dell'epitelio germinativo. Ne consegue un'attività steroidolitica ed un'altra antiproliferativa germinale da parte dell'OxA (Barreiro et al., 2005). Nel compartimento tubulare del testicolo l'OxA potrebbe agire in maniera paracrina, in quanto in alcuni citotipi germinali è stata riscontrata immunoreattività per Ox1R (Karteris et al., 2004). Al contrario, l'azione svolta dall'OxA nel compartimento interstiziale del testicolo non è ancora del tutto chiara.

Le funzioni del testicolo sono regolate da tre tipi di sostanze biologicamente attive:

a) le gonadotropine ipofisarie, che regolano le principali funzioni delle gonadi maschili, quali la steroidogenesi e lo sviluppo delle cellule spermatiche;

b) un pool di sostanze molto numeroso, che comprende l'OxA, prodotte dal testicolo, che hanno modalità d'azione simil-endocrina regolando in tal modo varie funzioni della gonade e sinergizzando o inibendo l'azione delle gonadotropine ipofisarie;

c) alcune molecole prodotte sia dall'ipotalamo/ipofisi che dal testicolo che regolano le funzioni gonadali agendo sia sulla cascata ipotalamo/ipofisi/gonadi sia a livello testicolare. Queste ultime comprendono l'OxA (Nurmio et al, 2009), l'ossido nitrico (Ambrosino et al, 2003), l'acido aspartico (La Manna et al, 2007), la grelina (Barreiro et al, 2005) e la leptina (Lopez et al, 2000).

La funzionalità della gonade maschile, quindi, non dipende solo dalla secrezione di gonadotropine ipofisarie, ma anche dalla capacità di auto-regolazione del testicolo stesso.

Sebbene ulteriori studi siano necessari per stabilire il meccanismo molecolare d'azione dell'OxA nel tratto genitale maschile dei mammiferi, i risultati ottenuti dimostrano che il peptide ed il relativo recettore 1 svolgono nell'apparato genitale dei mammiferi un'azione la cui importanza, oggi accertata, è destinata probabilmente ad aumentare in un immediato futuro.

## 6. BIBLIOGRAFIA

Abrahamsson PA, di Sant'Agnese PA. Neuroendocrine cells in the human prostate gland. *J Androl* 1993; 14: 307-309.

Al-Barazanji KA, Wilson S, Baker J, Jessop DS, Harbuz MS. Central orexin-A activates hypothalamic-pituitary-adrenal axis and stimulates hypothalamic corticotropin releasing factor and arginine vasopressin neurones in conscious rats. *J Neuroendocrinol* 2001; 13: 421-424.

Ambrosino A, Russo D, Lamanna C, Assisi L, Rizzo M, Vittoria A, Cecio A. Isoforms of nitric oxide synthase in the pig testis. *Acta Vet Brno* 2003; 72: 493-498.

Arihara Z, Takahashi K, Murakami O, Totsune K, Sone M, Satoh F, Ito S, Mouri T. Immunoreactive orexin-A in human plasma. *Peptides* 2001; 22: 139-142.

Arrighi S, Cremonesi F, Bosi G, Domeneghini C. Endocrine-paracrine cells of the male urogenital apparatus: a comparative histochemical and immunohistochemical study in some domestic ungulates. *Anat Histol Embryol* 2004; 33: 225-232.

Backberg M, Hervieu G, Wilson S, Meister B. Orexin receptor-1 (OX-R1) immunoreactivity in chemically identified neurons of the hypothalamus: focus on orexin targets involved in control of food and water intake. *Eur J Neurosci* 2002; 15: 315-328.

Barriero, R. Pineda, V.M. Navarro, M. Lopez, J.S. Souminen, L. Pinilla, R. Senaris, J. Toppari, E. Aguilar, C. Dieguez, M. Tena-Sempere: Orexin 1 receptor messenger ribonucleic acid expression and stimulation of testosterone secretion by orexin A in rat testis. *Endocrinology* 2004; 145: 2297-2306.

Barreiro ML, Pineda R, Gaytan F, Archanco m, Burrell MA, Castellano JM, hakovirta H, Nurmio M, Pinilla L, aguilar E, Toppati J, Dieguez C, Tena-Sempere M. Pattern of orexin expression and direct biological actions of orexin-A in the rat testis. *Endocrinology* 2005; 146: 5164-5175.

Bingham S, Davey PT, Babbs AJ, Irving EA, Sammons MJ, Wyles M, Jeffrey P, Cutler L, Riba I, Johns A, Porter RA, Upton N, Hunter AJ, Parsons AA. Orexin-A, an hypothalamic peptide with analgesic properties. *Pain* 2001; 92: 81-90.

Blanco M, López M, García-Caballero T, Gallego R, Vázquez-Boquete A, Morel G, Señarls R, Casanueva F, Diéguez C, Beiras A.

Cellular localization of orexin receptors in human pituitary. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 1616-1619.

Blanco M, García-Caballero T, Fraga M, Gallego R, Cuevas J, Forteza J, Beiras A, Diéguez C. Cellular localization of orexin receptors in human adrenal gland, adrenocortical adenomas and pheochromocytomas. *Regul Pept* 2002; 104: 161-165.

Blanco M, Garcia-Caballero T, Callego R, Dieguez C, Beiras A. Cellular localization of orexins in human anterior pituitary. *Histochem Cell Biol* 2003; 120: 259-264.

Briski KP, Sylvester PW. Hypothalamic orexin-A-immunopositive neurons express Fos in response to central glucopenia. *Neuroreport* 2001; 12: 531-534.

Burdyga G, Lal S, Spiller D, Jiang W, Thompson D, Attwood S, Saeed S, Grundy D, Varro A, Dimaline R, Dockray GJ. Localization of orexin-1 receptors to vagal afferent neurons in the rat and humans. *Gastroenterology* 2003; 124: 129-139.

Chemelli RM, Willie JT, Sinton CM, Elmquist JK, Scammell T, Lee C, Richardson JA, Williams SC, Xiong Y, Kisanuki Y, Fitch TE, Nakazato M, Hammer RE, Saper CB, Yanagisawa M. Narcolepsy in

orexin knockout mice: molecular genetics of sleep regulation. *Cell* 1999; 98:437-451.

Chen CT, Dun SL, Kwok EH, Dun NJ, Chang JK. Orexin A-like immunoreactivity in the rat brain. *Neurosci Lett* 1999; 260: 161-164.

Chen C, Xu R. The in vitro regulation of growth hormone secretion by orexins. *Endocrine* 2003; 22: 57-66.

Chen J, Randeva HS. Genomic organization of mouse orexin receptors: characterization of two novel tissue-specific splice variants. *Mol Endocrinol* 2004; 18: 2790-2804.

Cheng SB, Kuchiiwa S, Gao HZ, Kuchiiwa T, Nakagawa S. Morphological study of orexin neurons in the hypothalamus of the Long-Evans rat, with special reference to co-expression of orexin and NADPH-diaphorase or nitric oxide synthase activities. *Neurosci Res* 2003; 46: 53-62.

Cutler DJ, Morris R, Sheridhar V, Wattam TA, Holmes S, Patel S, Arch JR, Wilson S, Buckingham RE, Evans ML, Leslie RA, Williams G. Differential distribution of orexin-A and orexin-B immunoreactivity in the rat brain and spinal cord. *Peptides* 1999; 20: 1455-1470.

Czaja K, Sienkiewicz W, Vittoria A, Costagliola A, Cecio A. Neuroendocrine cells in the female urogenital tract of the pig, and their immunohistochemical characterization. *Acta Anat* 1996; 157: 11-19.

Date Y, Ueta Y, Yamashita H, Yamaguchi H, Matsukura S, Kangawa K, Sakurai T, Yanagisawa M, Nakazato M. Orexins, orexigenic hypothalamic peptides, interact with autonomic, neuroendocrine and neuroregulatory systems. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 748-753.

Date Y, Mondal MA, Matsuhara S, Ueta Y, Yamashita H, Kaiya H, Kangawa K, Nakazato M. Distribution of orexin/hypocretin in the rat median eminence and pituitary. *Mol Brain Res* 2000; 76: 1-6.

de Lecea L, Kilduff TS, Peyron C, Gao X, Foye PE, Danielson PE, Fukuhara C, Battenberg EL, Gautvik VT, Bartlett II FS, Frankel WN, van den Pol AN, Bloom FE, Gautvik KM, Sutcliffe JG. The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proc Natl Acad Sci* 1998; 95: 322-327.

Dyer CJ, Touchette KJ, Carroll JA, Allee GL, Matteri RL. Cloning of porcine prepro-orexin cDNA and effects of an intramuscular injection of synthetic porcine orexin-B on feed intake in young pigs. *Domest Anim Endocrinol* 1999; 16: 145-148.

Eggermann E, Serafin M, Bayer L, et al. Orexins/hypocretins excite basal forebrain cholinergic neurones. *Neuroscience* 2001; 108: 177-181.

Ehrström M, Gustafsson T, Finn A, Kirchgessner A, Grybäck P, Jacobsson H, Hellström PM, Näslund E. Inhibitory effect of exogenous orexin a on gastric emptying, plasma leptin, and the distribution of orexin and orexin receptors in the gut and pancreas in man. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 2370-2377.

Fadel J, Deutch AY. Anatomical substrates of orexin-dopamine interactions: lateral hypothalamic projections to the ventral tegmental area. *Neuroscience* 2002; 111: 379-387.

Frungieri MB, Gonzalez-Calvar SI, Rubio M, Ozu M, Lustig L, Calandra RS. Serotonin in golden hamster testes: testicular levels, immunolocalization and role during sexual development and photoperiodic regression-recrudescence transition. *Neuroendocrinology* 1999; 69: 299-308.

Greco MA, Shiromani PJ. Hypocretin receptor protein and mRNA expression in the dorsolateral pons of rats. *Brain Res Mol Brain Res* 2001; 88: 176-182.



Griffond B, Risold PY, Jacquemard C, Colard C, Fellmann D. Insulin-induced hypoglycemia increases preprohypocretin (orexin) mRNA in the rat lateral hypothalamic area. *Neurosci Lett* 1999; 262: 77-80.

Hakansson M, de Lecea L, Sutcliffe JG, Yanagisawa M, Meister B. Leptin receptor- and STAT3-immunoreactivities in hypocretin/orexin neurones of the lateral hypothalamus. *J Neuroendocrinol* 1999; 11: 653-663.

Hanyu S, Iwanaga T, Kano K, Fujita T. Distribution of serotonin-immunoreactive paraneurons in the lower urinary tract of dogs. *Am J Anat* 1987; 180: 349-356.

Hara J, Beuckmann CT, Nambu T, Willie JT, Chemelli RM, Sinton CM, Sugiyama F, Yagami K, Goto K, Yanagisawa M, Sakurai T. Genetic ablation of orexin neurons in mice results in narcolepsy, hypophagia, and obesity. *Neuron* 2001; 30: 345-54

Helpap B, Köllermann J. Undifferentiated carcinoma of the prostate with small cell features: immunohistochemical subtyping and reflections on histogenesis. *Virchows Arch* 1999; 434: 385-391.

Hervieu GJ, Cluderay JE, Harrison DC, Roberts JC, Leslie RA. Gene expression and protein distribution of the orexin-1 receptor in the rat brain and spinal cord. *Neuroscience* 2001; 103: 777-797.

Hirota K, Kushikata T, Kudo M, et al. Orexin A and B evoke noradrenaline release from rat cerebrocortical slices. *Br J Pharmacol* 2001; 134: 1461-1466.

Horvath TL, Peyron C, Diano S, Ivanov A, Aston-Jones G, Kilduff TS, van Den Pol AN. Hypocretin (orexin) activation and synaptic innervation of the locus coeruleus noradrenergic system. *J Comp Neurol* 1999; 415: 145-159.

Ida T, Nakahara K, Murakami T, Hanada R, Nakazato M, Murakami N. Possible involvement of orexin in the stress reaction in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 270: 318-323.

Johren O, Neidert SJ, Kummer M, Dendorfer A, Dominiak P. Prepro-orexin and orexin receptor mRNAs are differentially expressed in peripheral tissues of male and female rats. *Endocrinology* 2001; 142: 3324-3331.

Karteris E, Chen J, Randeve HS. Expression of human prepro-orexin and signalling characteristics of orexin receptors in the male reproductive system. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89:1957-1962.

Kawada Y, Ueno S, Asayama K, Tsutsui M, Utsunomiya K, Toyohira Y, Morisada N, Tanaka K, Shirahata A, Yanagihara N. Stimulation of catecholamine synthesis by orexin-A in bovine adrenal medullary cells through orexin receptor 1. *Biochem Pharmacol* 2003; 66: 141-147.

Kirchgessner AL, Liu M. Orexin synthesis and response in the gut. *Neuron* 1999; 24: 941-951.

Kohsaka A, Watanobe H, Kakizaki Y, Suda T, Schioth HB. A significant participation of orexin-A, a potent orexigenic peptide, in the preovulatory luteinizing hormone and prolactin surges in the rat. *Brain Res* 2001; 898: 166-170.

Kukkonen JP, Akerman KE. Orexin receptors couple to  $\text{Ca}^{2+}$  channels different from store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  channels. *Neuroreport* 2001; 12: 2017-2001.

Kukkonen JP, Holmqvist T, Ammoun S, Akerman KE. Functions of the orexigenic/hypocretinerigic system. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002, 283: C1567-1591.

Lamanna C, Assisi L, Vittoria A, Botte V, Di Fiore MM. D-Aspartic acid and nitric oxide as regulators of androgen production in boar testis. *Theriogenology* 2007; 67: 249-254.

López M, Seoane L, García MC, Lago F, Casanueva FF, Señarís R, Diéguez C. Leptin regulation of prepro-orexin and orexin receptor mRNA levels in the hypothalamus. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 269: 41-45.

López M, Seoane LM, Tovar S, Nogueiras R, Diéguez C, Señarís R. Orexin-A regulates growth hormone-releasing hormone mRNA content in a nucleus-specific manner and somatostatin mRNA content in a growth hormone-dependent fashion in the rat hypothalamus. *Eur J Neurosci* 2004; 19: 2080-2088.

Lu XY, Bagnol D, Burke S, Akil H, Watson SJ. Differential distribution and regulation of OX1 and OX2 orexin/hypocretin receptor messenger RNA in the brain upon fasting. *Horm Behav* 2000; 37: 335-344.

Lund PE, Shariatmadari R, Uustare A, et al. The orexin OX1 receptor activates a novel  $\text{Ca}^{2+}$  influx pathway necessary for coupling to phospholipase C. *J Biol Chem* 2000; 275: 30806-30812.

Malendowicz LK, Jedrzejczak N, Belloni AS, Trejter M, Hochól A, Nussdorfer GG. Effects of orexins A and B on the secretory and proliferative activity of immature and regenerating rat adrenal glands. *Histol Histopathol* 2001; 16: 713-717.

Marcus, C.J. Aschkenosi, C.E. Lee, R.M. Chemelli, C.B. Saper, M. Yanagisawa, J.K. Elmquist: Differential expression of orexin receptors 1 and 2 in the rat brain. *J Comp Neurol* 2001; 435: 6-25.

Matsuki T, Sakurai T. Orexins and orexin receptors: from molecules to integrative physiology. *Results Probl Cell Differ* 2008; 46: 27-55.

Mazzocchi G, Malendowicz LK, Gottardo L, Aragona F, Nussdorfer GG. Orexin A stimulates cortisol secretion from human adrenocortical cells through activation of the adenylate cyclase-dependent signaling cascade. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 778-782.

Mercer JG, Speakman JR. Hypothalamic neuropeptide mechanisms for regulating energy balance: from rodent models to human obesity. *Neurosci Biobehav Rev* 2001; 25: 101-116.

Mignot E, Lammers GJ, Ripley B, Okun M, Nevsimalova S, Overeem S, Vankova J, Black J, Harsh J, Bassetti C, Schrader H, Nishino S. The role of cerebrospinal fluid hypocretin measurement in the diagnosis of narcolepsy and other hypersomnias. *Arch Neurol* 2002; 59: 1553-1562.

Mikkelsen JD, Hauser F, deLecea L, Sutcliffe JG, Kilduff TS, Calgari C, Pévet P, Simonneaux V. Hypocretin (orexin) in the rat pineal gland: a central transmitter with effects on noradrenaline-induced release of melatonin. *Eur J Neurosci* 2001; 14: 419-425.

Mileykovskiy BY, Kiyashchenko LI, Siegel JM. Muscle tone facilitation and inhibition after orexin-a (hypocretin-1) microinjections into the medial medulla. *J Neurophysiol* 2002; 87: 2480-2489.

Mitsuma T, Hirooka Y, Kayama, Mori Y, Yokoi Y, Rhue N, Ping J, Izumi M, Ikai R, Adachi K, Nogimori T. Radioimmunoassay for orexin A. *Life Sci* 2000; 66: 897-904.

Moore RY, Abrahamson EA, Van Den Pol A. The hypocretin neuron system: an arousal system in the human brain. *Arch Ital Biol* 2001; 139: 195-205.

Muraki Y, Yamanaka A, Tsujino N, Kilduff TS, Goto K, Sakurai T. Serotonergic regulation of the orexin/hypocretin neurons through the 5-HT<sub>1A</sub> receptor. *J Neurosci* 2004; 24: 7159-7166.

Nakabayashi M, Suzuki T, Takahashi K, Totsune K, Muramatsu Y, Kaneko C, Date F, Takeyama J, Darnel AD, Moriya T, Sasano

H.Orexin-A expression in human peripheral tissues. *Mol Cell Endocrinol* 2003; 205: 43-50.

Nambu T, Sakurai T, Mizukami K, Hosoya Y, Yanagisawa M, Goto K. Distribution of orexin neurons in the adult rat brain. *Brain Res* 1999, 827: 243-260.

Näslund E, Ehrström M, Ma J, Hellström PM, Kirchgessner AL. Localization and effects of orexin on fasting motility in the rat duodenum. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; 282: G470-479.

Nurmio M, Tena-Sempere M, Toppari J. Orexins and the regulation of the hypothalamic-pituitary-testicular axis. *Acta Physiol* 2009, doi:10.1111/j 1748-1716.

Obermair A, Koller S, Crandon AJ, Perrin L, Nicklin JL. Primary Bartholin gland carcinoma: a report of seven cases. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 2001; 41: 78-81.

Ohkubo T, Tsukada A, Shamoto K. cDNA cloning of chicken orexin receptor and tissue distribution: sexually dimorphic expression in chicken gonads. *J Mol Endocrinol* 2003; 31: 499-508.

Pavone LM, Tafuri S, Avallone L, Staiano N, Vittoria A. Expression of the orexin A and its receptor 1 in the vestibular glands of the cattle genital tract. *Anat Rec (Hoboken)* 2009; 292: 202-206.

Peyron C, Tighe DK, van den Pol AN, de Lecea L, Heller HC, Sutcliffe TS. Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *J Neurosci* 1998; 18: 9996-10015.

Randeva HS, Karteris E, Grammatopoulos D, Hillhouse EW. Expression of orexin-A and functional orexin type 2 receptors in the human adult adrenals: implications for adrenal function and energy homeostasis. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 4808-4813.

Rodgers RJ, Halford JC, Nunes de Souza RL, Canto de Souza AL, Piper DC, Arch JR, Upton N, Porter RA, Johns A, Blundell JE. SB-334867, a selective orexin-1 receptor antagonist, enhances behavioural satiety and blocks the hyperphagic effect of orexin-A in rats. *Eur J Neurosci* 2001;13: 1444-1452.

Rouet-Benzineb P, Rouyer-Fessard C, Jarry A, Avondo V, Pouzet C, Yanagisawa M, Laboisce C, Laburthe M, Voisin T. Orexins acting at native OX(1) receptor in colon cancer and neuroblastoma cells or at recombinant OX(1) receptor suppress cell growth by inducing apoptosis. *J Biol Chem* 2004; 279: 45875-45886.



Russell SH, Small CJ, Dakin CL, Abbott CR, Morgan DG, Ghatei MA, Bloom SR. The central effects of orexin-A in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in vivo and in vitro in male rats. *J Neuroendocrinol* 2001; 13: 561-566.

Russo F, Vittoria A. Neuroendocrine cells in the vestibular glands of the genital tract of cows and pigs. *Acta Histochem* 2006; 108: 351-355.

Russo F, Pavone LM, Tafuri S, Avallone L, Staiano N, Vittoria A. Expression of orexin A and its receptor 1 in the bovine urethroprostatic complex. *Anat Rec (Hoboken)* 2008; 291:169-174.

Sakurai, A. Amemiya, M. Ishii, I. Matsuzaki, R.M. Chemelli, H. Tanaka, S.C. Williams, J.A. Richardson, G.P. Kozlowski, S. Wilson, J.R. Arch, R.E. Buckingham, A.C. Haynes, S.A. Carr, R.S. Annan, D.E. McNulty, W.S. Liu, J.A. Terret, N.A. Elshourbagy, D.J. Bergsma, M. Yanagisawa: Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behaviour. *Cell* 1998; 92: 573-585.

Sakurai T. Reverse pharmacology of orexin: from an orphan GPCR to integrative physiology. *Regulat Pept* 2005; 126: 3-10.

Seoane LM, Tovar SA, Perez D, Mallo F, Lopez M, Señaris R, Casanueva FF, Dieguez C. Orexin A suppresses in vivo GH secretion. *Eur J Endocrinol* 2004; 150: 731-736.

Shibahara M, Sakurai T, Nambu T, Takenouchi T, Iwaasa H, Egashira SI, Ihara M, Goto K. Structure, tissue distribution and pharmacological characterization of *Xenopus* orexins. *Peptides* 1999; 20: 1169-1176.

Silveyra P, Lux-Lantos V, Libertun C. Both orexin receptors are expressed in rat ovaries and fluctuate with the estrous cycle: effects of orexin receptor antagonists on gonadotropins and ovulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007; 293: E977-985.

Slone S, Reynolds L, Gall S, Peiper S, Martin A, Ackermann D, O'Connor D. Localization of chromogranin, synaptophysin, serotonin, and CXCR2 in neuroendocrine cells of the minor vestibular glands: an immunohistochemical study. *Int J Gynecol Pathol* 1999; 18: 360-365.

Spinazzi R, Rucinski M, Neri G, Malendowicz LK, Nussdorfer GG. Preproorexin and orexin receptors are expressed in cortisol-secreting adrenocortical adenomas, and orexins stimulate in vitro cortisol secretion and growth of tumor cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 3544-3549, a.

Spinazzi R, Ziolkowska A, Neri G, et al. Orexins modulate the growth of cultured rat adrenocortical cells, acting through type 1 and type 2 receptors coupled to the MAPK p42/p44- and p38-dependent cascades. *Int J Mol Med* 2005; 15: 847-852, b.

Tafari S, Pavone LM, Lo Muto R, Basile M, Langella E, Fiorillo E, Avallone L, Staiano N, Vittoria A. Expression of orexin A and its receptor 1 in the rat epididymis. *Regul Pept* 2009; 155: 1-5.

Taheri S, Mahmoodi M, Opacka-Juffry J, Ghatei MA, Bloom SR. Distribution and quantification of immunoreactive orexin A in rat tissues. *FEBS Lett* 1999; 457: 157-161.

Takahashi K, Arihara Z, Suzuki T, Sone M, Kikuchi K, Sasano H, Murakami O, Totsune K. Expression of orexin-A and orexin receptors in the kidney and the presence of orexin-A like immunoreactivity in human urine. *Peptides* 2006; 27: 871-877.

Tao R, Ma Z, McKenna JT, Thakkar MM, Winston S, Strecker RE, McCarley RW. Differential effect of orexins (hypocretins) on serotonin release in the dorsal and median raphe nuclei of freely behaving rats. *Neuroscience* 2006; 141: 1101-1105.

Thannickal TC, Moore RY, Nienhuis R, Ramanathan L, Gulyani S, Aldrich M, Cornford M, Siegel JM. Reduced number of hypocretin neurons in human narcolepsy. *Neuron* 2000; 27: 469-474.

Trivedi P, Yu H, MacNeil DJ, Van der Ploeg LH, Guan XM. Distribution of orexin receptor mRNA in the rat brain. *FEBS Lett* 1998; 438: 71-75.

Vittoria A, La Mura E, Cocca T, Cecio A. Serotonin-, somatostatin- and chromogranin A-containing cells of the urethro-prostatic complex in the sheep. An immunocytochemical and immunofluorescent study. *J Anat* 1990; 171: 169-178.

Vittoria A, Cocca T, La Mura E, Cecio A. Immunocytochemistry of paraneurons in the female urethra of the horse, cattle, sheep, and pig. *Anat Rec* 1992; 233: 18-24.

Xu R, Roh SG, Gong C, et al. Orexin-B augments voltage-gated L-type  $\text{Ca}^{2+}$  current via protein kinase C-mediated signalling pathway in ovine somatotropes. *Neuroendocrinology* 2003; 77: 141-152.

Xu R, Wang Q, Yan M, et al. Orexin-A augments voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  currents and synergistically increases growth hormone (GH) secretion with GH-releasing hormone in primary cultured ovine somatotropes. *Endocrinology* 2002; 143: 4609-4619.

Yamada H, Okumura T, Motomura W, Kobayashi Y, Kohgo Y. Inhibition of food intake by central injection of anti-orexin antibody in fasted rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 267: 527-531.

Yui R, Nagata Y, Fujita T. Immunocytochemical studies on the islet and the gut of the arctic lamprey, *Lampetra japonica*. *Arch Histol Cytol* 1988; 51: 109-119.

Wang JB, Murata T, Narita K, Honda K, Higuchi T. Variation in the expression of orexin and orexin receptors in the rat hypothalamus during the estrous cycle, pregnancy, parturition, and lactation. *Endocrine* 2003; 22: 127-34.

Wang JJ, Chen YH, Li KY, Sun FY. Differential sensitivity of GABAergic and glycinergic inputs to orexin-A in preganglionic cardiac vagal neurons of newborn rats. *Acta Pharmacol Sin* 2005; 26: 1442-1447.

Warner TF, Tomic S, Chang CK. Neuroendocrine cell-axonal complexes in the minor vestibular gland. *J Reprod Med* 1996; 41: 397-402.

Wong PYD, Gong XD, Leung GPH, Cheuk BLY. Formation of the epididymal fluid microenvironment. In: Robaire R, Hinton B, editors.

The epididymis: from molecules to clinical practice. New York: Kluwer Plenum Press 2001; 119-130.

Zhang S, Blache D, Vercoe PE, Adam CL, Blackberry MA, Findlay PA, Eidne KA, Martin GB. Expression of orexin receptors in the brain and peripheral tissues of the male sheep. Regul Pept 2005; 124: 81-87.

Zhou WL, Leung PS, Wong TP, Dun NJ, Wong PYD, Chan HC. Local regulation of epididymal anion secretion by pituitary adenilate cyclase-activating polypeptides. J Endocrinol 1997; 154: 389-395.

Zhu, Y. Miwa, A. Yamanaka, T. Yada, M. Shibahara, Y. Abe: Orexin receptor type 1 couples exclusively to pertussin toxin-insensitive G-protein, while orexin receptor type 2 couples to both pertussin toxin-sensitive and -insensitive G-proteins. J Pharmacol Sci 2003; 92: 259-266.

Ziolkowska A, Spinazzi R, Albertin G, Nowak M, Malendowicz LK, Tortorella C, Nussdorfer GG. Orexins stimulate glucocorticoid secretion from cultured rat and human adrenocortical cells, exclusively acting via the OX1 receptor. J Steroid Biochem Mol Biol 2005; 96: 423-429.

## **7. RINGRAZIAMENTI**

Ringrazio la prof.ssa Norma Staiano che mi ha guidato durante il ciclo di dottorato stimolando il mio interesse nella ricerca scientifica e dandomi l'opportunità di accrescere sia il mio "background" scientifico che le mie competenze nel lavoro sperimentale. Ringrazio in particolar modo il prof. Alfredo Vittoria che ha dato un notevole contributo alla realizzazione della mia tesi di dottorato sia da un punto di vista sperimentale, addestrandomi nella sperimentazione relativa alle indagini di immunoistochimica, sia da un punto di vista culturale consentendomi di ampliare le mie conoscenze dell'anatomia comparata e della biologia cellulare. Ringrazio la dott.ssa Simona Tafuri per avermi seguito con dedizione nello svolgimento della tesi di dottorato relativa alla sperimentazione biochimica, dandomi sempre preziosi suggerimenti ed insegnamenti. Ringrazio tutti i componenti del gruppo di ricerca coordinato dalla prof. Staiano con i quali ho interagito, condividendo la frequenza in laboratorio. Infine, ringrazio il prof. Giuseppe Paino, coordinatore del dottorato, il prof. Vincenzo Esposito, il prof. Gaetano Scala, direttore del Dipartimento di Strutture, Funzioni e Tecnologie

Biologiche, tutto il personale docente del Dipartimento, e il personale tecnico-amministrativo che, sempre presenti ed attivi, mi hanno consentito di esplicare al meglio il ciclo di dottorato.



## 8. ELENCO DEI LAVORI PUBBLICATI

- **Lavori in extenso**

1. Tafuri S, **Lo Muto R**, Pavone LM, Valiante S, Costagliola A, Staiano N, Vittoria A. Novel localization of orexin A in the tubular cytotypes of the rat testis. Regul Pept 164:53-57, 2010.
2. Pavone LM, Spina A, Mastellone V, **Lo Muto R**, Fiorillo E, Avallone L. Role of the serotonin transporter in heart valve development and disease. Vet Res Commun 33:117-119, 2009.
3. Tafuri S, Pavone LM, **Lo Muto R**, Basile M, Langella E, Fiorillo E, Avallone L, Staiano N, Vittoria A. Expression of orexin A and its receptor 1 in the rat epididymis. Regul Pept 155:1-5, 2009.
4. Pavone LM, Tafuri S, **Lo Muto R**, Spina A, Lychkova AE, Mastellone V, Vittoria A, Avallone L, Staiano N. Expression of the serotonin transporter (SERT) in the genital tract of cattle. Regul Pept 154:1-4, 2009.
5. Pavone LM, Mithbaokar P, Mastellone V, **Lo Muto R**, Spina A, Maharajan V, Paino G, Avallone L. Expression of the serotonin transporter (SERT) gene during mouse development. Vet Res Commun 32:S167-S169, 2008.

6. Pavone LM, Spina A, **Lo Muto R**, Santoro D, Mastellone V, Avallone L.  
Heart valve cardiomyocytes of mouse embryos express the serotonin transporter SERT. *Biochem Biophys Res Commun* 377: 419-422, 2008.

- **Comunicazioni a congressi internazionali**

1. Pavone LM, Spina A, **Lo Muto R**, Mastellone V, Avallone L, Baldini A.  
Serotonin transporter role in heart development focusing on cardiac valve and conduction system. Proceedings of the Bi-annual Meeting of the Working Group on Developmental Anatomy and Pathology, Alberobello (Bari), Italy, March 2008, p. 40.

- **Comunicazioni a congressi nazionali**

1. Pavone LM, Mastellone V, **Lo Muto R**, Spina A, Mithbaokar P, Alimenti E, Lombardi P, Avallone L. Studio dell'espressione del gene SERT nello sviluppo embrionale del cuore. Atti del VII Congresso della Società Italiana di Fisiologia Veterinaria, Giugno 2007, Silvi Marina (Teramo).
2. **Lo Muto R**, Pavone LM, Mithbaokar P, Spina A, Tafuri S, Maharajan V  
Espressione del gene SERT nello sviluppo embrionale del cervello di topo. Atti delle Giornate scientifiche del Polo delle Scienze e delle Tecnologie per la Vita, Napoli, Settembre 2007, p. 409.

3. Spina A, Pavone LM, Mithbaokar P, **Lo Muto R**, Tafuri S, Della Morte R, Avallone L. Espressione del gene SERT nello sviluppo embrionale del cuore nel topo. Atti delle Giornate scientifiche del Polo delle Scienze e delle Tecnologie per la Vita, Napoli, Settembre 2007, p. 14.
4. Tafuri S, Russo F, Pavone LM, Spina A, **Lo Muto R**, Della Morte R, Vittoria A, Staiano N. Localization and biological activity of orexin A in the bovine prostate. Atti del LXI Congresso Nazionale della Società Italiana di Scienze Veterinarie, Salsomaggiore Terme (Pr), Settembre 2007, p. 21-22.
5. Pavone LM, Mithbaokar P, Tafuri S, Mastellone V, **Lo Muto R**, Spina A, Maharajan V, Paino G, Avallone L. Expression of the serotonin transporter (SERT) gene during mouse development. Atti del LXI Congresso Nazionale della Società Italiana di Scienze Veterinarie, Salsomaggiore Terme (Pr), Settembre 2007, pp. 85-86.
6. Spina A, **Lo Muto R**, Santoro D, Fiorillo E, Tafuri S, Della Morte R, Pavone LM, Staiano N. Serotonin transporter (SERT) expression and role in mouse heart and brain development. Atti del Retreat del Dipartimento di Biochimica e Biotecnologie Mediche dell'Università di Napoli Federico II, Napoli, Aprile 2008, p. 22.
7. Vittoria A, **Lo Muto R**, Langella E, Petrosino G, Staiano N. Expression of orexin A and its receptor 1 in the rat epididymis., Atti del LXII

Congresso Nazionale della Società Italiana di Scienze Veterinarie San Benedetto del Tronto, Settembre 2008, p. 39.

8. Pavone LM, Spina A, Mastellone V, **Lo Muto R**, Fiorillo E, Avallone L. Role of the serotonin transporter in the regulation of cardiovascular functions. Atti del LXII Congresso Nazionale della Società Italiana di Scienze Veterinarie, San Benedetto del Tronto, Settembre 2008, p. 55.
9. **Lo Muto R**, Langella E, Tafuri S, Andreozzi G, Della Morte R, Petrosino G, Vittoria A. Espressione del peptide orexina A e del suo recettore 1 nell'apparato genitale di alcuni mammiferi. Atti delle Giornate scientifiche del Polo delle Scienze e Tecnologie per la Vita, Napoli, Dicembre 2008.
10. **Lo Muto R**, Tafuri S, Petrosino G, Langella E, Vittoria A. Presenza della proteina CD68 nel testicolo e nell'epididimo del ratto. Atti delle Giornate scientifiche del Polo delle Scienze e Tecnologie per la Vita, Napoli, Dicembre 2008.